

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
KEEMIA INSTITUUT

Karina Solovjova

**Akrülodaaniga märgistatud cAMP-st sõltuva proteiinkinaasi A
katalüütilise alaühiku seostumine inhibiitorpeptiididega**

Magistritöö (30 EAP)

Juhendaja: Prof. Jaak Järv

Tartu 2015

Sisukord

Töös kasutatud lühendid	4
1. Sissejuhatus	6
2. Kirjanduse ülevaade	7
2.1. Proteiinkinaasid	7
2.1.1. cAMP-ist sõltuv proteiinkinaas A	7
2.1.2. PKA inhibiitorid	10
2.2. Allosteerilise efekti uurimine	11
2.2.1. Fluorestsentspektroskoopia kasutamine ligandide ja PKAc kompleksi tekke uurimisel	12
2.3. Peptiidsüntees	13
2.3.1. Tahkefaasiline peptiidsüntees (SPPS)	13
2.3.2. SPPS strateegiad	15
2.3.3. Tahked kandjad	15
2.3.4. Kaitserühmad	16
2.3.5. Aminohapete aktiveerimine	17
2.3.6. Toimuvate reaktsioonide jälgimine	18
2.3.7. Peptiidi mahavõtmine tahkelt kandjalt	19
3. Eksperimentaalne osa	20
3.1. Töö detailsed eesmärgid	20
3.2. Aparatuur ja töövahendid	20
3.3. Kasutatud reaktiivide ja solventide füüsikalised omadused	22
3.4. Kasutatud meetodikad	23
3.4.1. Peptiidsüntees tahkel kandjal (SPPS) Fmoc-strateegia kasutamisel	23
3.4.2. Varulahuste kontsentratsiooni määramine UV-Vis spektroskoopia abil	24
3.4.3. Fluorestsentspektrite analüüs	25
3.4.4. PKAc denaturatsiooni kineetika	26
4. Tulemused ja arutelu	27
4.1. Sünteesitud inhibiitorpeptiidid	27
4.2. Varulahuste kontsentratsioonid	28

4.3. Valk-ligand komplekside dissotsiatsioonikonstantide määramine	29
4.4. Allosteerilised efektid	31
5. Kokkuvõte	33
6. Summary	34
7. Tänuavaldus	35
8. Kasutatud kirjandus	36

Lisa

Töös kasutatud lühendid

Ac ₂ O	atsetanhüdriid
ACN	atsetonitriil
Acr	akrüloodaan, 6-aktüloüül-2-dimetüülaminonaftaleen
AH	aminohape
Ala, A	alaniin
Arg, R	arginiin
Asn, N	asparagiin
Asp, D	asparagiinhape
ATP	adenosiin-5'-trifosfaat
Boc	tert-butüüloksükarbonüül-
BOP	(bensotriasool-1-üloksü)tris(dimetüülamino)fosfoonium heksafluorofosfaat
Bzl	bensüül-
cAMP	tsükliline adenosin-5'-trifosfaat
Cys, C	tsüsteiin
DCM	diklorometaan
DiC	<i>N,N'</i> -diisopropüülkarbodiimiid
DiPEA	diisopropüületüülamiin
EDC	<i>N</i> -(3-dimetüülaminopropüül)- <i>N'</i> -etüülkarbodiimiid
Fmoc	9-fluorenüülmetüüloksükarbonüül-
For	formüül-
Gln, Q	glutamiin
Glu, E	glutamiinhape
Gly, G	glütsiin
HATU	1-[bis(dimetüülamino)metüleen]-1 <i>H</i> -1,2,3-triasool[a,5- <i>b</i>]püridiinium 3-oksido heksafluorofosfaat
HBTU	<i>O</i> -(bensotriasool-1-üül)- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametüüluroonium heksafluorofosfaat
His, H	histidiin
HOAt	1-hüdroksü-7-asabensotriasool
HOBt	n-hüdroksübensotriasool
HODhbt	3-hüdroksü-1,2,3-bensotriasiin-4(3 <i>H</i>)-oon
HOt	<i>N</i> -hüdroksütetrasool

HPLC-MS	kõrgsurvevedelikkromatograafia-massispektromeetria
Ile, I	isoleutsiin
KT	Kaiser ehk ninhüdroin test
Leu, L	leutsiin
Lys, K	lüsiin
Met, M	metioniin
MOPS	3-morfolinopropaan-1-sulfoonhape
NMM	<i>N</i> -metüülmorfoliin
Oxyrna	etüül-2-tsüano-2-(hüdroksüimino)atsetaat
Pbf	2,2,4,6,7-pentametüüldihüdrobensofuraan-5-sulfonüül-
Phe, F	fenüülalaniin
PKA	proteiinkinaas A
PKAc-Acr	akrüüloetaniga mõrgistatud proteiinkinaasi A katalüütiline alaühik
PKI	proteiinkinaasi inhibiitor
Pro, P	proliin
PyBOP	(bensotriazol-1-üloksü)tris(dimetüülamino)tripürrolidinofoosoonium heksafluorofosfaat
Ser, S	seriin
SPPS	tahkefaasiline peptiidsüntees
TBTU	<i>O</i> -(bensotriasool-1-üül)- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametüüluroonium tetrafluoroboraat
<i>t</i> Bu	tert-butüül-
TFA	trifluoroetaanhape
Thr, T	treoniin
TiS	triisopropüülsilaan
Tos	tosüül-
Trp, W	trüptofaan
Trt	tritüül-
Tyr, Y	türosiin
UV-Vis	ultraviolett ja nähtav valgus
Val, V	valiin

1. Sissejuhatus

Üheks enamlevinuks valkude posttranslatoorse modifitseerimise teeks on nende fosforüülimine proteiinkinaaside poolt. Fosforüülimise reaktsioon toimub kuni 30% looduses esinevate valkude korral ning selle abil reguleeritakse valkude omadusi, eelkõige nende katalüütilist aktiivsust (Ubersax ja Ferrel, 2007). Seetõttu on valkude fosforüülimine tähtis elutegevusega seotud protsesside regulatsiooni seisukohast ning proteiinkinaasid on osutunud väga olulisteks ravimite toime sihtmärkideks. Viimane asjaolu muudab huvitavaks ka proteiinkinaaside toimemehhanismi uuringud.

Enam kui 500 tuntud proteiinkinaasi hulgast omab erilist tähendust cAMP poolt reguleeritud proteiinkinaas A, mida on uuritud väga põhjalikult, ning mis on tänaseni üks proteiinkinaaside „mudelensüüme“ (Manning *et al.*, 2002). Seda on soodustanud asjaolu, et selle ensüümi aktiivsuse eest vastutavat katalüütilist alaühikut on võimalik suhteliselt lihtsalt eraldada ja puhastada ning kasutada selle ensüümi toimemehhanismi ja struktuuri uuringuteks (Taylor *et al.*, 2004). Sellest lähtuvalt on ka käesolevas töös kasutatud proteiinkinaasi A katalüütilist alaühikut.

Kuna ligandide seostumine PKAc aktiivtsentris põhjustab olulisi valgusstruktuuri ümberkorraldusi, on võimalik nende muutuste jälgimine fluorestsentssondide abil. Need sondi molekulid seotakse kovalentselt valguga ja nende fluorestsents muutub, kui valguskonformatsiooni muutusega kaasnevad sondi mikrokeskkonna muutused. Käesolevas töös kasutati selliselt märgistatud proteiinkinaas A katalüütilist alaühikut, kus fluorestsentssondiks oli akrolüdaan (Kivi *et al.*, 2013). Märgistatud ensüüm oli valmistatud meie uurimisgrupis R. Kivi poolt. Samuti kasutati tema poolt välja töötatud spektrofluorimeetrilist meetodit, mis võimaldab iseloomustada erinevat tüüpi ligandide sidumist selle valguga (Kivi *et al.*, 2013).

Antud töö raames uuriti seeria peptiidide seostumist selle ensüümiga. Kuna eelnevalt on fluorestsentssondi abil uuritud peamiselt nukleotiidide sidumist, siis käesoleva töö tulemused laiendavad oluliselt teadmisi PKAc toimemehhanismist. Töös kasutatud peptiidid sünteesiti SPPS meetodil ning need ained on varem kirjeldatud kui PKAc poolt katalüüsitava substraatreaktsiooni inhibiitorid (Cheng *et al.*, 1985). Kuna selle töö tulemusena osutus võimalikuks uurida nende peptiidide vahetut seostumist valguga, siis saadud tulemused on olulised PKAc korral ilmnevate allosteeriliste efektide iseloomustamiseks.

2. Kirjanduse ülevaade

2.1. Proteiinkinaasid

Ensüüme on võimalik vaadelda bioloogiliste katalüsaatoritena, mis madaldavad organismis toimuvate reaktsioonide aktivatsioonibarjääri. Ensüümid on erilised oma kõrge selektiivsuse ja spetsiifilisuse poolest. Vastavalt funktsioonidele, liigitatakse ensüüme kuueks rühmaks: oksüdoreduktaasid, ligaasid, transferaasid, proteaasid, isomeraasid, lüaasid ja hüdrolaasid.

Proteiinkinaasid kuuluvad fosfotransferaaside hulka, mis liidavad nende substraadiks olevatele valkudele fosfaatrühma, muutes sellega nende aktiivsust ja funktsioone. Seda protsessi nimetatakse reguleerivaks fosforüülimiseks ja selle näol on tegemist ühe kõige tähtsama valkude posttranslatoorse modifikatsiooniga. Fosforüülimine mängib tähtsat rolli signaaliülekandes, sellisel viisil reguleeritakse palju erinevaid bioloogilisi protesse, nt eukariootse raku elutegevust: jagunemist, metabolismi, liikumist, eluiga ja apoptoosi (Cheetham, 2004). See aga tähendab, et igasugused häired fosforüülimise protsessis muudavad raku funktsioone ja võivad tekitada haigusi (nt vähi erinevad vormid) (Shchemelinin *et al.*, 2006). Selle tõttu vaadeldakse proteiinkinaase potentsiaalsete ravimite sihtmärkidena ja nende inhibiitoreid – potentsiaalsete ravimikandidaatidena.

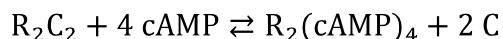
Proteiinkinaaside rühm on üks suurematest ensüümide hulgast – neid kodeerib ligikaudu 2% eukariootse raku geene (Manning *et al.*, 2002). Defineeriti, et inimgenoomis on ligikaudu 518 kinaase kodeerivat geeni ja 106 kinaase kodeerivat pseudogeeni, ja neid kinaase võib jagada seitsmeks rühmaks vastavalt nende struktuuridele: nt AGC perekond koosneb A, G ja C tüüpi proteiinkinaasidest (Manning *et al.*, 2002). Mõnevõrra mugavam on substraadil põhinev klassifitseerimine, kus proteiinkinaase jagatakse kolmeks rühmaks vastavalt fosforüülitavale aminohappejäägile: seriin/treoniin-, türosiin- ja duaalse iseloomuga proteiinkinaasid (Lauze *et al.*, 1995; Knighton *et al.*, 1991).

2.1.1. cAMP-ist sõltuv proteiinkinaas A

cAMP-ist sõltuv proteiinkinaas A (E.C.2.7.11.11, edaspidi PKA) on seriin/treoniin tüüpi kinaas, mis kuulub AGC kinaaside rühma. PKA on bisubstraatne ensüüm, mille substraatideks on ATP ja fosforüülitav valk. Selle ensüümi kineetilised ja struktuursed omadused on hästi uuritud, samuti on määratud nii vaba ensüümi kui ka erinevate ensüüm-substraat komplekside kristallstruktuurid (Taylor *et al.*, 2005). Teisisõnu on PKA enimuuritud proteiinkinaas. Tänu sellele ja lisaks arvestades ka tema võrdlemisi lihtsat struktuuri kasutatakse teda sageli mudelensüümina

proteiinkinaaside alastes uuringutes. Lisaks on PKA võimalik ekspresseerida ja puhastada suurtes kogustes (Taylor *et al.*, 2004).

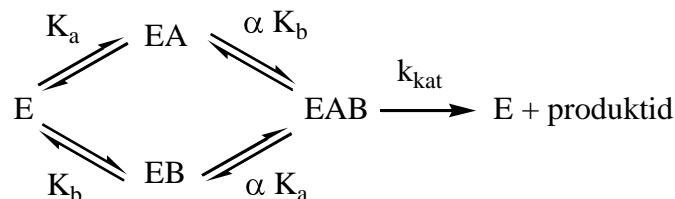
Raku sees eksisteerib PKA inaktiivse tetrameerina R_2C_2 , kus R on regulatoorne alaühik ja C on katalüütiline alaühik, mis teostabki fosforüülimist. Aktiivseks ta saab pärast kompleksi dissotsiatsiooni, mis sõltub cAMP-i tasemest rakus. Katalüütilise alaühiku vabanemiseks peavad neli cAMP molekuli seostuma samaaegselt mõlema regulatoorse alaühiku sidumistaskudega. (Mg^{2+} juuresolekul) (Choi ja Zocchi, 2006):



Erinevalt teistelt proteiinkinaasidelt, on PKA korral võimalik eraldada katalüütilist alaühikut C (edaspidi PKAc) ja kasutada seda *in vitro* uuringutes eraldi, ilma R-ühikuta. PKAc on monomeerne vees lahustuv valk massiga orienteeruvalt 40 800 Da, mille üldjärjestus oli defineeritud Shoji *et al.*, poolt (Shoji *et al.*, 1983). PKAc eksisteerib mitme isovormi kujul: $C\alpha$, $C\beta$, $C\gamma$. Isovormide põhiline erinevus seisneb nende jaotuses organismis, ekspresseerimise tasemes, funktsioonides ja selektiivsuses substraatide suhtes. Erinevus nende järjestuses ei ole väga suur (Doskeland *et al.*, 1993; Diskar *et al.*, 2010). Neist domineerib $C\alpha$ isovorm, mis on ekspresseeritud enamikes rakkudes (Thullner *et al.*, 2000). Samuti on olemas isovormid ka regulatoorsel alaühikul R (Taylor *et al.*, 2005).

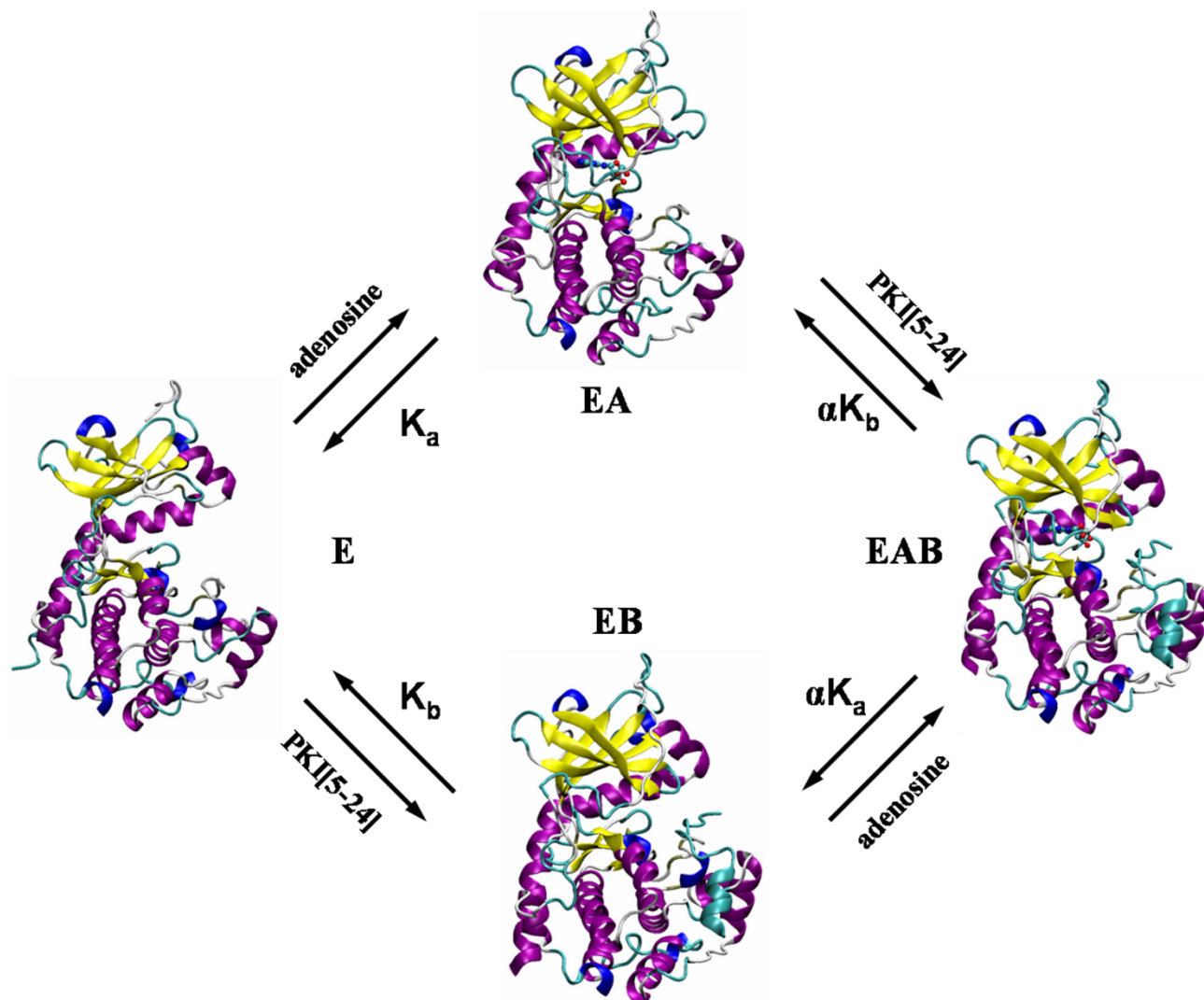
PKAc kristallstruktuuri uuringute käigus tehti selgeks, et PKAc koosneb kahest kergesti identifitseerivast domeenist, mida nimetatakse N- ja C-terminaalseks osaks. Tõestati ka, et selline struktuur on iseloomulik kõigile isovormidele. N-terminaalses osas asub ATP sidumistasku ja selle struktuur on sarnane enamiku proteiinkinaaside puhul. C-terminaalses osas asub peptiidse substraati sidumiskiirkond (Johnson *et al.*, 2001).

Fosforüülimise reaktsiooni käigus kantakse fosfaatrühm ATP-lt otse üle substraadiks olevale valgule või peptiidile ja kovalentset vaheühendit ei teki (Ho *et al.*, 1988). ATP sidumisel mängib tähtsat rolli kofaktor – Mg^{2+} . Täpsemini, efektiivseks ATP sidumiseks on vaja kahte Mg-katiooni: esimene koordineerib β - ja γ -fosfaatrühma, teine – α - ja γ -fosfaatrühma (Johnson *et al.*, 2001). Seega peab fosforüülimisreaktsiooni toimumiseks tekkima kolmikkompleks PKAc (E), ATP (A) peptiidsubstraadi (B) vahel (**Joonis 1**):



Joonis 1. Fosforüülimisreakstiooni skeem koos komplekside dissotsiatsioonikonstantidega K_a ja K_b ning katalüütilise staadiumi kiiruskonstandiga.

Sellel skeemil toodud komplekside struktuurid on iseloomustatud **Joonisel 2**, kus on näidatud vaba PKAc ning selle ensüümi kompleksid nukleotiidi ja inhibiitorpeptiidiga (Kuznetsov, 2009).



Joonis 2. Ligandide sidumise mõju PKAc struktuurile (Kuznetsov, 2009).

Peptiidsubstraadi struktuuris peavad esinema teatud kriitilised aminohapped, mis peavad olema kindlas asukohas, et oleks võimalik peptiidi seostumine sidumiskiirgusega. Peptiidi

struktuuri varieerimisega tehti kindlaks, et PKAc nn „minimaalne substraat“ on RRASV, kuna selle peptiidid edasine lühendamine vähendab oluliselt fosforüülimise kiirust. Peptiidsubstraadi molekulaarse äratundmise seisukohast osutusid eriti tähtsateks aminohapeteks kaks R jääki, mis on olemas ka järjestuses RRASV (Zetterqvist ja Ragnarsson, 1982). Üldjuhul võib substraadi äratundmiseks vajalikku peptiidijärjestuse motiivi väljendada kujul -R-R-X-S/T-Y-, kus X on varieeruv aminohape ja Y on hüdrofoobne aminohape. See on PKA jaoks nn „konsensuslik motiiv“ (Ubersax ja Ferrell, 2007).

Lisaks on olemas ka teised faktorid, mis mõjutavad substraadi sidumist (Ubersax ja Ferrell, 2007). Omavahel võivad interakteeruda ka struktuurid, mis asuvad küllaltki kaugel primaarsest sidumispirkonnast. Arvatavasti esineb interaktsioon substraadi N-terminaalse otsa või R¹⁵ ja sidumispirkonna struktuuride vahel (Kim *et al.*, 2007; Pinna ja Ruzzene, 1996).

2.1.2. PKA inhibiitorid

Kuna PKA on bisubstraatne ensüüm, siis eksisteerivad kolme tüüpi inhibiitorid. Esimest tüüpi inhibiitorid seostuvad ATP sidumistaskuga ja neid esineb küllaltki palju. Tuntud on mitmed looduslikud inhibiitorid ja veelgi enam on loodud nende sünteetilise analooge. Nende inhibiitorite hulgast on kõige tuntumad H89, H8 ja H7 (Engh *et al.*, 1996; Hidaka *et al.*, 1984).

Peptiidse sidumispirkonna inhibiitoreid on uuritud vähem. Tavaliselt on lühemad sünteetilised peptiidid suhteliselt nõrgad PKA inhibiitorid (Bogoyevitch *et al.*, 2005). Seda ka siis, kui nad sisaldavad konsensusliku motiivi elemente. Samas eksisteerivad kaks looduslikku peptiidset inhibiitorit, mille toime on väga tugev. Nendeks on selle ensüümi regulatoorne alaühik R ja termostabiilne PKA inhibiitor (PKI). Need on pikad polüpeptiidid, mille ahelas on ka konsensusmotiivi elemendid. Samas ei ole nendes peptiidides substraadile vajalikku Ser jääki (Wiley *et al.*, 1999). Lähtudes PKI struktuurist on tuletatud ka väga hea PKA peptiidsubstraat Kemptiid (Kübler *et al.*, 1989).

PKI on endogeenne termostabiilne valk, mis koosneb 75 aminohappejäägist. Tema füsioloogilist rolli ei ole täpselt teada, arvatavasti see takistab PKAc kogunemist rakutuuma sees (Fantozzi *et al.*, 1992). Samas nii PKI kui ka temast tuletatud fragmentide ja modifitseeritud fragmentide inhibeerimisvõime on väga palju uuritud. Üldjuhul oli teada, et mida pikem on fragment, seda parem on tema inhibeerimisvõime – see on arvatavasti põhjustatud lisainteraktsioonide ilmunisest (Cheng *et al.*, 1985). Selle seeria ühendid olid eeskujuks ka käesoleva töö kavandamisel, sest sünteesitud peptiidid on PKI struktuuri fragmendid

Kolmandat tüüpi inhibiitorid on nn „bisubstraatsed“ inhibiitorid. Need molekulid on

sünteesitud selliselt, et nad seostuksid samaaegselt nii ATP sidumistaskusse kui ka peptiidse ligandi sidumiskohaga. Tavaliselt on nendeks inhibiitoriteks mingit ATP analoogi ja peptiidi sisaldavad konjugaadid (Ricouart *et al.*, 1991).

2.2. Allosteerilise efekti uurimine

Allosteeria on kompleksne nähtus, kus ühe molekuli sidumine valguga määrab teise molekuli sidumise tugevuse sama valguga mingi teise piirkonnaga. Oluline on, et nende molekulide struktuurid on erinevad (allo = erinev). Teada on ka olukorrad, kus sama ligand seostub sama valguga erinevate sidumiskohtadega ja see nähtus avaldub nn „kooperatiivsuse“ga. Nende mõlema nähtuse korral on ilmselgelt tegu kahe sidumiskoha vaheliste toimetega läbi valgumolekuli struktuuri (Koshland *et al.*, 1966; Cui ja Karplus, 2008). Sellise arusaamise kohaselt on kõik bisubstraatsed ensüümid potentsiaalsed allosteerilise toime näited.

Allosteeria nähtuse bioloogiline mõte seisneb selles, et see aitab ensüümi paremini eristada oma füsioloogilisi substraate ehk süvendab biokatalüüsi (Kuznetsov ja Järv, 2008).

Formaalselt kirjeldab sidumiskohtade vahelist toimet reaktsiooniskeem, mis on toodud **Joonisel 1**. Sellest skeemist on näha, et valksubstraadi sidumine ensüümile ja ensüüm-ATP kompleksile ei pea olema kirjeldatud sama dissotsiatsiooni konstandiga, sest parameeter α võib omada ka ühest suuremaid või väiksemaid väärtusi. Kuna parameeter α iseloomustab seda, kas ja kui tugevasti on erinevate ligandide sidumisomadused omavahel sõltuvuses, siis võib seda parameetrit vaadelda kui allosteerilise efekti suuruse iseloomustajat (Kuznetsov ja Järv, 2008).

Allosteeriline efekt eeldab vastavate sidumispirkondade vahelist toimet. See on võimalik läbi valgumolekuli struktuuri muutuste. Kuna PKAc korral on tegemist väga dünaamilise molekuliga, siis on ka allosteeriliste efektide esinemine igati ootuspärane. Pealegi on teada, et substraatide sidumine mõjutab PKA konformatsiooni väga suurel määral (Taylor *et al.*, 2005).

Selleks, et allosteerilist efekti kvantitatiivselt iseloomustada, on vaja määrata parameetrid α . Nende parameetrite arvutamiseks on omakorda vaja teada ensüüm-ligand kompleksi dissotsiatsioonikonstanti ja sama ligandi dissotsiatsiooni konstanti juhul, kui ensüüm on küllastatud teise ligandiga (Kivi *et al.*, 2013).

Peptiidide uurimise seisukohast on seega vaja uurida peptiidide seostumist vabale ensüümile ja ensüüm-ATP kompleksile. Viimane variant realiseerub peptiidide inhibeerimisomaduste uurimisel, sest selleks kasutatakse substraatreaktsiooni kineetika andmeid, mis on saadud tingimustes, kus ensüüm on küllastatud ATP poolt ning inhibeerimist tekitab substraatpeptiidiga konkureeriv inhibiitorpeptiid. Ligandide seostumist vaba ensüümiga võib samuti uurida lähtudes

substraatreaktsiooni kineetikast. Seejuures tuleb aga teha erakordselt palju kineetilisi mõõtmisi (Kuznetsov ja Järv, 2008).

Seetõttu on eriline huvi nende meetodite vastu, mis võimaldavad iseloomustada ligandi seostumist vabale ensüümile. Need meetodid on: H/D vahetuse massispektromeetria (Taylor *et al.*, 2004), SAXS (*small angle X-ray scattering*) (Engh *et al.*, 1996) ja TMR (Masterson *et al.*, 2008). Aga eelnimetatud meetodid on töömahukad ja alati ei võimalda arvutuslikult kvantifitseerida allosteerilist efekti. Samas Kivi *et al.* poolt väljapakutud spektrofluorimeetriline meetod võimaldab jälgida ligand-ensüümi kompleksi denaturatsiooni ajas ja saadud andmetest määrata ka ligandi dissotsiatsioonikonstanti (Kivi *et al.*, 2013).

2.2.1. Fluorestsentspektroskoopia kasutamine ligandide ja PKAc kompleksi tekke uurimisel

Ensüümi struktuuri muutusi saab jälgida valgumolekulile kovalentse sidemega kinnitatud fluorestseeruva sondi abil, mille fluorestsents muutub olenevalt sondi mikrokeskkonnast. PKAc jaoks on selliseks sondiks akrülodaan (Prendergast *et al.*, 1983).

Varasemates töödes on näidatud, et PKAc molekuliga seotud akrülodaani fluorestsentspekter muutub nukleotiidide sidumisel Täpsemini, PKAc-Acr fluorestsentspekttri maksimum on 496 nm juures, kuid ligandi sidumise tulemusena esineb punanihe ja intensiivsuse kahanemine (Lew *et al.*, 1997). Arvatavasti see on seletatav ensüümi konformatsiooni muutusega, mille tulemusena surutakse fluorestsentssond osaliselt valgumolekulist välja, kus ta satub polarsemasse keskkonda. See on kooskõlas akrülodaani ja tsüsteiini kompleksi fluorestsentspekttriga vesilahuses, mis asub 532 nm juures (Prendergast *et al.*, 1983). Kahjuks segab selliste mõõtmiste tegemist PKAc denaturatsioon, mis toimub mõõtmisteks kasutatavas MOPS puhvris ja on eriti oluline madalama kontsentratsiooniga (ca 50 nM) valgulahuste korral.

Seda arvestades on meie laboratooriumis loodud alternatiivne meetoodika, mis kasutab valk - ligandi kompleksi dissotsiatsioonikonstandi määramiseks samuti spektrofluorimeetriat, mille abil jälgitakse aga valgumolekuliga toimuvat denaturatsiooni ning edasi uuritakse ka ligandi toimet sellele protsessile. Varasemad andmed (Lew *et al.*, 1997) ja ka meie laboris saadud andmed on kinnitanud, et akrülodaaniga märkimine ei muuda PKAc katalüütilisi omadusi (Kivi *et al.*, 2013).

Akrülodaani fluorestsentsi muutuse järgi on võimalik jälgida natiivse ensüümi (N) kadumist ja denatureeritud ensüümi (D) teket (Kivi *et al.*, 2013). Denaturatsiooni protsessi kirjeldab lihtne reaktsiooniskeem:



Jälgides fluorestsentsi muutust ajas on võimalik määrata selle protsessi kiiruskonstant k_d . On samuti näidatud, et spetsiifiliste ligandide lisamisel denaturatsiooni kiirus väheneb ning seda nähtust kirjeldab reaktsiooni skeem:



kus reaktsiooni näiv kiiruskonstant k_{obs} oleneb ligandi kontsentratsioonist

$$k_{\text{obs}} = \frac{k_d}{1 + \frac{L}{K_L}} \quad (3)$$

Kui on määratud kiiruskonstandid k_d ja k_{obs} , on sellest võrrandist lihtne arvutada ensüümi ja ligandi kompleksi dissotsiatsiooni tasakaalukonstant K_L (Kivi *et al.*, 2013). Seda meetodikat kasutati käesolevas töös, et määrata sünteesitud inhibiitorpeptiidide jaoks K_L väärtused.

2.3. Peptiidsüntees

Peptiidid on võimalik vaadelda biopolümeeridena, kus monomeerid ehk aminohapped on seotud omavahel peptiidsideme kaudu. Peptiidside moodustub ühe aminohappe karboksüülrühma ja teise aminohappe aminorühma vahel. Nomenklatuuri järgi peptiidid on lühema järjestusega kui valgud ja orienteeruvaks piiriks on 50 aminohappejääki (Mäde *et al.*, 2014).

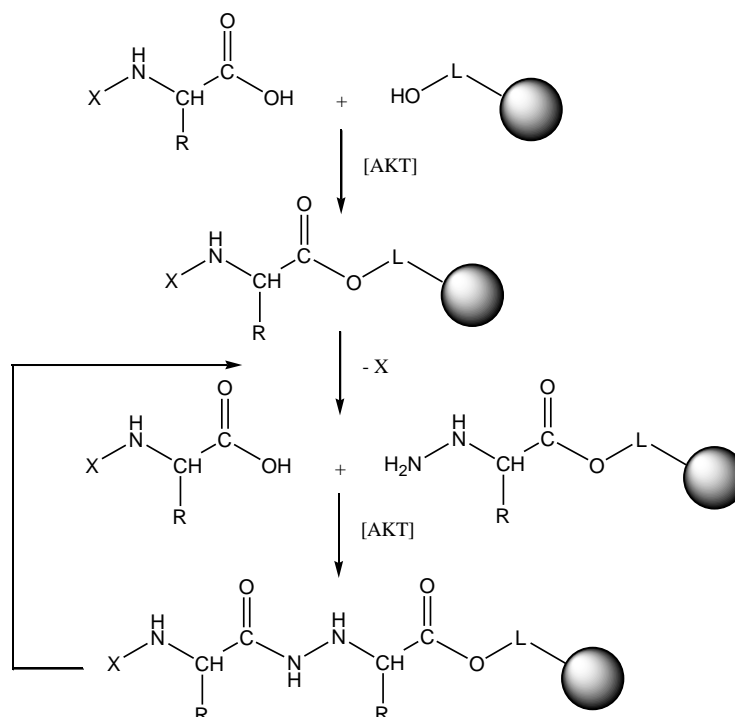
Looduslike peptiidide biosüntees toimub raku sees kindlate ensüümide toimel. Samuti peptiide on võimalik toota ka laboratoorsetes tingimustes, kasutades selleks erinevaid meetodeid: eraldades neid sobivatest bioloogilistes materjalidest, fragmenteerides juba olemasolevaid peptiide, kasutades rekombinantse DNA tehnoloogiat või rakuvaba ekspresserimissüsteemi, samuti on olemas ka ensümaatilise ja keemilise meetodid (Guzman *et al.*, 2007). Meetod valitakse lähtudes eesmärkidest, samuti ka peptiidi pikkusest ja järjestusest ning võttes arvesse ka meetodi hinda ja keerukust.

Tihti teostatakse peptiidide keemiline süntees lahuses, aga selle peamiseks puuduseks on ajamahukus: põhiprodukti on vaja puhastada pärast igat reaktsiooni etappi. Samas süntees lahuses on majanduslikult õigustatum, kui on vaja toota suurt kogust peptiide (Carpino *et al.*, 2003; Guzman *et al.*, 2007).

2.3.1. Tahkefaasiline peptiidsüntees (SPPS)

Keemilise meetodi oluline edasiarendus toimus 1963 aastal, kui B. Merrifield töötas välja nn tahkefaasilise peptiidsünteesi (SPPS) meetodika (Merrifield 1963). Selle näol on tegemist

heterogeense etapiviisilise reaktsiooniga. Kõige esimene aminohape kinnitatakse tahkele polümeersele kandjale C-terminuse kaudu. Ahela kasv toimub vaba N-terminuse atsüülimise kaudu. Tahkefaasilise peptiidsünteesi skemaatiline näide on toodud **Joonisel 3**.



Joonis 3. Tahkefaasilise peptiidsünteesi skeem. R – aminohappe külgrühm, X – aminorühma kaitserühm, L – sidumisdomeen tahke kandja ja esimese aminohappe vahel, [AKT] – peptiidsideme moodustamiseks kasutatud aktivaatorid. 2 ja 3 etapid korratakse kuni vajaliku järjestusega peptiidi saamiseni.

Antud metoodika osutus nii mugavaks, et see adapteeriti ka teiste biopolümeeride sünteesiks, nt oligosahhariidide ja oligonukleotiidide (Seitz, 1998). Lisaks on sellist sünteesi võimalik ka automatiseerida (Mäde *et al.*, 2014).

Tänapäeval on SPPS protseduuri täiendatud. On välja töötatud uued aktivatsiooni, kaitsmise, atsüülimise, mahavõtmise ja puhastamise eeskirjad, samuti on täiustatud ka võimalike kaitserühmade ja aktivaatorite ridu (Al-Warhi *et al.*, 2012; Mäde *et al.*, 2014, Isidro-Llobet *et al.*, 2009).

Võrreldes peptiidsünteesiga lahuses seisnevad SPPS suurimad eelised võimaluses eemaldada reaktsiooni kõrvalprodukte filtreerimise teel ja võrdlemisi väikestes reaktsiooniaegades. Puuduseks on aga pikemate peptiidahelate agregatsioon ja mittetäielike järjestuste teke ja akumulatsioon sünteesi käigus (Guzman *et al.*, 2007).

Solventidena kasutatakse tavaliselt DMF, DCM ja NMP, mis on optimaalsed oma omaduste poolt (viskoossus ning reaktiivide ja tahke kandja solvatatsioon), kuid on toksilised (Jad *et al.*,

2015). Hiljuti uuriti ka loodusesõbralikumate solventide kasutamise võimalus: THF, ACN, vesi ning isegi ioonvedelikud ja nanoosakesed (Acosta *et al.*, 2009; Tietze *et al.*, 2012; Hojo *et al.*, 2011; Jad *et al.*, 2015). Neid solvente on tunduvalt lihtsam utiliseerida, lisaks saab nende kasutamisega vältida ratsemisatsiooni, tõsta reaktsioonide saagist ja parandada reaktiivide ja peptiidahelate lahustuvust. Samas nõuavad nad spetsiifiliste kandjate kasutamist.

Reaktsiooni kiirendamiseks ja tahke kandja pundumise parandamiseks soojendatakse reaktsioonisegu tihti kuni 50-80°C. Kui on aga olemas ratsemisatsiooni oht, teostatakse reaktsioonid temperatuuril alla 50°C. Näiteks on Pedersen *et al.*, poolt välja pakutud laboratoorse mikrolaineahju kasutamise idee. Võrreldes tavaliste meetoditega seisneb selle eelis reaktsioonisegu ühtlasemas soojendamises (Pedersen *et al.*, 2012).

SPPS võimaldab suhteliselt kiiresti ja lihtsalt sünteesida keskmise pikkusega peptiide. Metoodika piiriks loetakse ligikaudu 100 aminohappejäägist koosnev järjestus (White *et al.*, 2004). Samas pikemate peptiidide sünteesi võib teostada fragmentide kaupa ja pärast panna need kokku, ehk ligeerida (Nishiuchi *et al.*, 1998).

2.3.2. SPPS strateegiad

Kaks põhilist SPPS strateegiat on Fmoc/*t*Bu ja Boc/Bzl. Nende erinevus seisneb kasutatavates kaitserühmades ja nende eemaldamise tingimustes. Fmoc/*t*Bu strateegias kasutatakse Fmoc-rühma N-terminuse kaitsmiseks ja seda eemaldatakse aluselistes tingimustes. Boc/Bzl strateegias peamiseks kaitserühmaks on Boc, mis eemaldatakse aga happelistes tingimustes. Mõlema strateegia puhul aminohapete külghelad on kaitstud püsivate kaitserühmadega, mis on stabiilsed N-terminuse kaitserühma mahavõtmise tingimustes (Guzman *et al.*, 2007).

Fmoc-strateegia eelis seisneb pehmemate sünteesitingimuste kasutamises, kuid siiski eksisteerib aminohapete ratsemisatsiooni oht (Benoiton *et al.*, 2005). Samas Boc-strateegia võib osutada mõnevõrra ohtlikuks korrosiivse toimega HF kasutamise tõttu (Pennington, 1994).

2.3.3. Tahked kandjad

Tahke kandja on polümeer, mis on jahvatatud kindla suurusjaotusega pulbriks. Polümeeri iseloomusest sõltuvad sellised olulised omadused, nagu keemiline inertsus, pundumine ja mehhaaniline stabiilsus. Mida paremini ta pundub kasutatavates solventides, seda parem on reaktiivide juurdepääs osakeste sees olevate sidumisdomeenide või kasvavate peptiidahelate juurde ja seda kõrgemad on sünteesi saagised. Polümeer peab olema ka mehhaaniliselt piisavalt stabiilne, et vastu pidada kiirele vaakumfiltratsioonile, ja keemiliselt inertne võrdlemisi karmides reaktsioonitingimustes (Guzman *et al.*, 2007). Kõige levinumateks polümeermaterjalideks on

põiksidestatud polüstüreen (1% divinülbenseeniga), polüamiid ja polüetüleenglükool. Nende funktsionaliseerimisel on saadud lai valik tahkeid kandjaid (Garcia Martin ja Albericio 2008).

Esimese aminohape ja tahke kandja vaheline side peab olema stabiilne sünteesitingimuste suhtes. Samas see peab olema ka siiski piisavalt kergesti hüdrolüüsitav, et lõpp-produkti saaks tahkelt kandjalt maha võtta võimalikult kiiresti ja kahjustamata. Kõige lihtsamal juhul aminohappe kinnitatakse otseselt tahke kandja külge, kuid palju rohkem levinud on kinnitamine sidumisdomeeni kaudu. Sidumisdomeeni kasutamise eelis seisneb võimaluses täiendavalt modifitseerida peptiid – tahke kandja sidet, tehes seda kas rohkem või vähem labiilseks kindlate reaktiivide suhtes, ning vähendada peptiidahelate agregatsiooni (Lloyd-Williams *et al.*, 1997). Näitena võib tuua käesolevas töös kasutatud tahket kandjat – Rink Amide MBHA, kus sidumisdomeeniks on Fmoc-rühmaga kaitstud p-metüülbenshüdrüülamiin.

Sidumisdomeenide teine funktsioon on peptiidi C-terminuse funktsionaliseerimine. Tavaliselt esimese aminohappe ja tahke kandja vahel tekitatakse kas amiid- või esterside (Guzman *et al.*, 2007), seega lõpp-produkt on siis vastavalt kas C-terminaalne amiid või hape. C-terminaalsed amiidid võivad olla eelistatud, kuna C-terminus amiidimine aitab neutraliseerida negatiivset laengut ja pikendab peptiidi säilimisaega. Lisaks C-terminaalsed amiidid on sarnasemad looduslikele peptiididele, kuna amidiimine on sageli esinev posttranslatorne modifikatsioon. Samuti on laialdaselt levinud ka N-terminaalsed modifikatsioonid, nagu näiteks atsetüülimine, tsüklisteerimine või konjugeerimine mingi biomolekuliga (Thundimadathil ja Gangakhedkar, 2014).

2.3.4. Kaitserühmad

Ebasoovituslike reaktsioonide kõrvaldamiseks kasutatakse ortogonaalsete kaitserühmade strateegiat, ehk tugevalt funktsionaliseeritud aminohapete külgrühmad kaitstakse püsivate kaitserühmadega. Püsivate kaitserühmade eemaldamine toimub sünteesi lõpus koos produkti mahavõtmisega tahkelt kandjalt. Üldjuhul Fmoc-strateegias aminohapete külgrühmad kaitstakse *t*Bu-ga, Boc-strateegias – Bzl-ga. (Guzman *et al.*, 2007).

Alifaatsed (G, A, V, L, I) ja kergelt funktsionaliseeritud (F, P) aminohapped ei vaja kaitsmist. Mõlemas strateegias enimkasutatavate kaitserühmade ja peamiste kõrvalreaktsioonide loetelu on esitatud alltoodud **Tabelis 1** (Isidro-Llobet *et al.*, 2009):

Tabel 1. Aminohapped ning Fmoc- ja Boc-strateegias enimkasutatavad kaitserühmad. On toodud ka peamised kõrvalreaktsioonid.

AH	Funktsionaal rühm	Fmoc-strateegia	Boc-strateegia	Peamised kõrvalreaktsioonid
R	guanidüül	Pbf	Tos	tsükliisatsioon: δ -laktaami teke
H	imidasoüül	Trt	Tos	ratsemisatsioon, atsüülimine
W	indoüül	Boc	For	alküülimine, oksüdeerimine
K	amino	Boc	Boc	hargnemine, atsüülimine
N, Q	amiid	Trt	Trt	deamiidimine, dehüdraatumine
D, E	karboksüül	<i>t</i> Bu	Bzl	tsükliisatsioon, hargnemine
S, T	hüdrosüül	<i>t</i> Bu	Bzl	dehüdraatumine, atsüülimine
Y	hüdrosüül	<i>t</i> Bu	Bzl	alküülimine, atsüülimine
M	metüültool	-	sulfoksiidi kujul	oksüdeerimine, alküüülimine
C	tiool	Trt	Bzl	alküülimine, oksüdeerimine

2.3.5. Aminohapete aktiveerimine

Oma iseloomu järgi on karboksüülrühm küllaltki nõrk elektrofiil. Tahkefaasilises peptiidsünteesis kasutatakse peptiidsideme tekitamisel karboksüülrühma aktiveerimist hea lahkuva rühma lisamise teel. Lisaks tuleb aktiveeritud aminohapet kasutada ülehulgas (2-10 ekv) (Al-Warhi *et al.*, 2012).

Enamik aktiveerimismeetodeid põhinevad aktiivse estri *in situ* moodustumisel. Sheehan ja Hess pakkusid välja DCC (ditsükloheksüülkarbodiimiid) ksautamise, mis on senini koos teiste karbodiimiididega (DiC, EDC · HCl) üks laialdasemalt kasutatav aktivaatorite rühm (Sheehan ja Hess, 1955). Nende kasutamisel tekib väga reaktsioonivõimeline O-atsüülisouurea. Puuduseks on aga kõrvalreaktsioonide toimumine (peamiselt ratsemisatsiooni) ja ebasoovitavate kõrvalproduktide teke. Neid on aga võimalik kõrvaldada lisandite kasutamisel. Üheks selleks lisandiks on N-hüdrosüsuktsinimiid (HOSu), kuid seda asendasid kiiresti 1-hüdrosübensotriasool (HOBt) ning sellele omaduste poolt sarnased HOAt, HODhbt, HOT, Oxyma *etc.* Sel juhul aktiveerimine toimub kahes etapis: esimeses tekib O-atsüülisouurea, teises etapis seda asendab 1-hüdrosübensotriasool, tekitades aktiivsetrit (OBt-estri). Viimane on samuti väga reaktsioonivõimeline, aga erinevalt karbodiimididest ei põhjusta ratsemisatsiooni (Al-Warhi *et al.*, 2012).

Hiljem võeti kasutusele teist tüüpi aktivaatoreid – fosfoonium- ja urooniumsoolasid (Gawne *et al.*, 1969; Dourtoglou *et al.*, 1984). Neist kõige esimesena kasutati BOP fosfooniumsoola, aga kuna selle kõrvalproduktid on kantserogeense toimega, siis asendati see vähem toksilise PyBOP-ga.

Urooniumsoolade peamised esindajad on TBTU, HBTU ja HATU. Mõlemat tüüpi soolade kasutamine nõuab aluse juuresolekut – DiPEA, NMM või kollidiini. Aktiveerimise tulemusena tekib OBt-ester. Edasiste uuringute käigus selgus, et HOBt ja teiste lisandite kasutamine kiirendab olulisel määral OBt-estri teket (Al-Warhi *et al.*, 2012).

Vähem levinuteks aktiveerimismeetodid seisnevad eelnevalt või *in situ* genereeritud sümmeetriliste anhüdriidide ja aminohapete haliidide kasutamises. Samuti on võimalik ka fosfororgaaniliste ühendite ja triasiinide kasutamine aminohapete aktiveerimiseks (Al-Warhi *et al.*, 2012).

2.3.6. Toimuvate reaktsioonide jälgimine

SPPS ei võimalda reaktsioonide jälgimist TLC, HPLC või mõnel muul viisil, v.a. tahke kandja alikvoodilt maha võetud produkti analüüs.

Enimlevinud meetodiks SPPS reaktsioonide jälgimiseks on ninhüdriin test ehk Kaiser test. Selle testi näol on tegemist väga tundliku kolorimeetrilise reaktsiooniga ja seda on võimalik teostada väikese tahke kandja alikvoodiga. Testi põhimõte seisneb vabade primaarsete aminorühmade detekteerimises: kuumutamisel nad reageerivad ninhüdriiniga, mille tulemusena tekib tumesinine kondensatsiooni produkt. Järelikult, kui kõik aminorühmad on kaitstud või atsüülitud, siis test on peaaegu värvitu (Kaiser *et al.*, 1970).

Aga Kaiser testil on olemas ka piirid. Näiteks, ei võimalda see detekteerida P, mis on iseloomu järgi sekundaarne amiin, mille tuvastamine nõuab nt kloroaniiltesti (Vojkovsky, 1995). Samuti ei anna see test piisavalt adekvaatset tulemust D, S, C või N kohta, kuna testi värvus võib olla tugevalt moonutatud. Pikad ja keerulised järjestused võivad ka mõjutada testi tulemust. Sellistel juhtudel vajab tulemuste interpreteerimine kompetentsust ja kogemust. Lisaks tarbib test küllaltki suurt hulka tahket kandjat ja võib olulisel moel vähendada lõpp-produkti saagist, eriti pikemate peptiidide sünteesimisel (Lloyd-Williams *et al.*, 1997). Vaatamata sellele on ninhüdriin test senini kõige populaarsem meetod SPPS reaktsioonide järgimiseks. Seega ta võimaldab määrata ajutise kaitserühma eemaldamis- ja atsüülimisreaktsioonide edukust.

Kaudne meetod jälgida reaktsioone on kaaluda tahket kandjat pärast igat atsüülimist. Põhimõte seisneb selles, et iga lisandunud aminohape suurendab tahke kandja massi. Teoreetiliselt see on väga täpne meetod, praktiliselt aga sõltub olulisel moel sellest, kui hästi kuivatatakse tahke kandja enne kaalumist, samuti ka toimunud reaktsiooni saagisest. Reaalselt seda meetodit kasutatakse tavaliselt ainult tahke kandja kaalumisel sünteesi lõpus vahetult enne peptiidi mahavõtmist, et orienteeruvalt hinnata sünteesi edukust (Lloyd-Williams *et al.*, 1997).

Vähem populaarsed, aga siiski kasulikud meetod on aminohapete analüüs ja Edmani degradatsioon. Esimene meetod võimaldab leida mahavõetud peptiidi alikvoodi üldkoostist. Selleks kõik peptiidsidemed hüdrolyüsitakse ning kvantifitseeritakse saadud produktid. Edmani degradatsioon võimaldab aga leida peptiidi kindlat järjestust. Põhimõte seisneb N-terminaalse aminohappe derivatiseerimises, mahavõtmises ja siis kvantifitseerimises. Mõlemad meetodid on automatiseeritavad (Schegg *et al.*, 1997; Smith, 2001).

2.3.7. Peptiidi mahavõtmine tahkelt kandjalt

Lõpp-produkti mahavõtmine tahkelt kandjalt on üks kõige tähtsamatest etappidest SPPS-is. Ühelt poolt peavad mahavõtmise tingimused olema piisavalt karmid, et hüdrolyüsida peptiidahela ja tahke kandja vahel olevat sidet, teiselt poolt nad ei tohi olla ülikarmid, et jätta peptiidahela kahjustamata ja mitte tekitada kõrvalreaktsioone. Mahavõtmise tingimused sõltuvad peamiselt kasutatud strateegiast ja peptiidahelas olevatest aminohapetest. Tavaliselt kasutatakse happelist hüdrolyüsi, kuid on olemas ka teised meetodid nagu fotolüüs, nukleofiilne mahavõtmine ja hüdrogenolüüs – need on kasulikud peptiidide fragmentide sünteesimisel ja mahavõtmisel, kui on vaja jätta külgrühmad kaitstuna (Lloyd-Williams *et al.*, 1997).

Boc-strateegia kasutamisel võetakse tavaliselt peptiide tahkelt kandjalt maha vedela HF abil. Vähem populaarsed, aga siiski kasutatavad happed on HBr või trifluorometüülsulfoon hape (TFMS). Fmoc-strateegias kasutatakse mahavõtmiseks TFA lahust DCM-s (Dick, 1994; Pennington, 1994).

Pärast peptiidi mahavõtmist on reaktsioonisegu täis mahavõetud kaitsmisrühmadest tekkinud karbokatioone. See võib põhjustada W, M, C, S, T ja Y funktsionaalrühmade alküülimist. Selle kõrvaldamiseks lisatakse mahavõtmise lahusesse ühendid, mis reageerivad tekkinud karbokatioonidega. Kõige populaarsemad on TiS, vesi fenool, kresool, etaanditool, tioanisool või vesi. Lisandi valik sõltub peptiidi järjestuse olevatest aminohapetest (Isidro-Llobet *et al.*, 2009). Samas nende lisamine vähendab happe kontsentratsiooni, mis võib põhjustada mahavõtmise aja pikenemist.

3. Eksperimentaalne osa

3.1. Töö detailsed eesmärgid

Käesoleva magistritöö eesmärkideks on:

1. Sünteesida SPPS Fmoc/*t*Bu strateegiat kasutades rida PKA inhibiitorpeptiide. Need peptiidid on proteiinkinaas A inhibiitorpeptiidi PKI fragmendid ning omavad sellist järjestust:

Lühend	Koht PKI algjärjestuses	Sünteesitud fragmendi järjestus	MW, g/mol
PKI1	16-22 (7 AH)	TGRRNAI-NH ₂	785,46
PKI2	14-22 (9 AH)	GRTGRRNAI-NH ₂	999,15
PKI2*	14-22* (9 AH)	GRTLRRNAI-NH ₂	1055,25
PKI3	9-22 (14 AH)	DFIASGRTGRRNAI-NH ₂	1532,73
PKI4	7-22 (16 AH)	YADFIASGRTGRRNAI-NH ₂	1766,98
PKI5	5-22 (18 AH)	TTYADFIASGRTGRRNAI-NH ₂	1969,19

2. Puhastada sünteesitud peptiidid ja identifitseerida neid HPLC ja MS abil.
3. Määrata sünteesitud peptiididest valmistatud varulahuste kontsentratsioon UV-Vis spektromeetria abil.
4. Kasutada peptiide sidumiskatsetes valguga, milleks on akrölüdaaniga modifitseeritud PKAc.
5. Iseloomustada peptiidide sidumisel esinevat allosteerilist efekti, võrreldes määratud dissotsiatsiooni tasakaalukonstante kirjanduses avaldatud inhibeerimiskonstantidega, mis on määratud substraatide (ATP) juuresolekul.

3.2. Aparatuur ja töövahendid

- Töös kasutatud reaktiivid ja solvendid osteti firmadest IrisBiotech, Sigma-Aldrich või Lachner, lahused valmistati Millipore seadmega puhastatud vees;
- Sünteesitud peptiidid analüüsiti C-18 kolonniga HPLC-süsteemi Shimadzu „Prominence“ ja LCMS-2020 Shimadzu mass-spektromeetriga;
- Sünteesitud peptiide puhastati C-3 kolonniga preparatiivse HPLC-süsteemi Agilent abil;
- Peptiidide varulahuste kontsentratsioon määrati Unicam UV 300 UV-Vis spektromeetriga;
- Fluorestsents spektrid registreeriti Horiba Scientific Fluoromax-4 spektrofluorimeetri abil;
- Fluorestsentsi spektrid analüüsiti meie laboris loodud akrölüdaaniga modifitseeritud PKAc fluorestsentsspektrite analüüsiks koostatud arvuste algoritmi abil.

- Andmete töötlemiseks kasutati arvutitarkvara komplekte GraphPad Prism ja Excel. Programmiga Prism arvutatud parameetrid on märgitud koos standarthälbega.

3.3. Kasutatud reaktiivide ja solventide füüsikalised omadused

Aine	M, g/mol	St, °C	Kt, °C	Tihedus, g/ml, 25 °C	n _D ²⁰
Ac ₂ O	102,09	−73	138-140	1,08	1,390
DCM	84,93	−97	39,8-40	1,325	1,424
DiPEA	129,24	−50	127	0,742	1,414
DMF	73,09	−61	153	0,944	1,430
Et ₂ O	74,12	−116	34,6	0,706	1,353
EtOH	46,07	−114	78	0,789	1,360
fenool	94,11	40-42	182	1,071	1,530
Fmoc-Ala-OH·H ₂ O	329,33	147-153	-	-	-
Fmoc-Arg(Pbf)-OH	648,77	132	-	-	-
Fmoc-Asn(Trt)-OH	596,68	202-203	-	-	-
Fmoc-Asp(<i>t</i> Bu)-OH	411,45	147-148	-	-	-
Fmoc-Gly-OH	297,32	174-175	-	-	-
Fmoc-Ile-OH	353,41	145-147	-	-	-
Fmoc-Leu-OH	353,41	154-155	-	-	-
Fmoc-Phe-OH	387,43	186-187	-	-	-
Fmoc-Ser(<i>t</i> Bu)-OH	383,44	128-130	-	-	-
Fmoc-Thr(<i>t</i> Bu)OH	397,48	130-132	-	-	-
Fmoc-Tyr(<i>t</i> Bu)-OH	459,53	150-152	-	-	-
HOBt	135,12	155-158	laguneb	-	-
MgCl ₂	95,21	714	1412	2,320	1,675
MOPS	209,26	277	laguneb	1,30 (teor.)	1,51 (teor.)
NaCl	58,44	801	1413	2,165	1,5442
ninhüdiin	178,14	250	laguneb	1,7 (teor.)	1,74 (teor.)
piperidiin	85,15	−13	106	0,862	1,452
TBTU	321,08	205	laguneb	-	-
TFA	114,02	−15,4	72,4	1,489	1,3
TiS	158,36	-	-	0,773	1,434

3.4. Kasutatud meetodikad

3.4.1. Peptiidsüntees tahkel kandjal (SPPS) Fmoc-strateegia kasutamisel

Peptiidid sünteesiti manuaalselt vastavalt alltoodud eeskirjale:

1. Tahke kandja ettevalmistamine sünteesiks: esiteks kaalutakse ettenähtud kogus tahket kandjat, kantakse üle reaktsioonikolonni, siis lisatakse DCM (umbes 2 ml iga 100 mg kohta) ja segu lastakse loksutada 20 min jooksul.

2. Fmoc-rühma eemaldamine: tahkele kandjale lisatakse 20% piperidiinilahus DMF-s ja lastakse loksutada 20 min, siis tahke kandja pestakse (DMF x 3, DCM x 3, DMF x 3).

3. Fmoc-rühma eemaldamise kontroll KT abil: väike kogus tahket kandjat pannakse eraldi viaalisse, lisatakse 2-3 tilka KT lahuseid ja inkubeeritakse 100°C mitte rohkem kui 5 min. Lahuse tumesinine või tumevioletne värvus tähendab Fmoc-rühma täielikku eemaldamist. Helekollane värvus tähendab vastupidist olukorda ja nõuab Fmoc-rühma eemaldamise kordamist.

4. Aminohappe sidumine: ettenähtud kogus aminohapet (2-5 ekv) kaalutakse ja lahustatakse minimaalses koguses DMF-s, siis lisatakse sellele aktivaatorid (2-5 ekv) ja DiPEA (4-10ekv). Järgmiselt aktiveeritud aminohappe lahus lisatakse tahkele kandjale ja lastakse loksutada 1-2 t sõltuvalt aminohapest. Vajadusel on võimalik õrnalt soojendada reaktsioonikolonni fööniga. Reaktisiooni lõpus pestakse tahke kandja (DMF x 3, DCM x 3, DMF x 3).

4a) Vajadusel tahke kandja funktsionaalrühmade hulk vähendatakse, lisades vähem kui 1 ekv aminohapet, samuti ka vähendatud hulk aktivaatoreid ja DiPEA. Kõik teised tingimused on samad nagu eelmises punktis. Kohe pärast reaktsiooni lõppu atsüülitakse reageerimata jäänud aminorühmad, vt. punkt 6).

5. Sidumise kontroll KT abil: korratakse punkt 3). Helekollane värvus tähendab täielikku sidumist (98-99%), tumesinine või tumevioletne tähendab mittetäielikku sidumist ja nõuab eelmise etapi kordamist.

6. Vajadusel reageerimata jäänud aminorühmad atsüülitakse kõrvalreaktsioonide eemaldamiseks. Selleks tahkele kandjale lisatakse Ac₂O lahus DCM-s.

7. Järgmiste aminohapete sidumine: korratakse sammud 2), 3), 4) ja 5).

8. Peptiidi mahavõtmine tahkelt kandjalt: eemaldatakse Fmoc-rühm vastavalt punktis 2) toodud eeskirjale, siis tahke kandja kuivatatakse ja vajadusel kaalutakse. Vahetult enne mahavõtmist valmistatakse TFA:TiS:H₂O lahus (95% : 2,5% : 2,5%), umbes 2 ml iga 100 mg tahket kandjat koos peptiidiga. Lahus lisatakse tahkele kandjale ja lastakse loksutada. Reaktsiooniaeg on vähemalt 2 t, kui järjestuses on R, siis iga R kohta lisandub üks tund. Pärast reaktsioonisegu filtreeritakse, pestakse mõni ml TFA-ga ja filtraat kantakse üle eraldi anumasse. TFA liig eemaldatakse N₂ joas. Järelejäänud lahusele lisatakse umbes 10 ml vett ja 40 ml jääkülma Et₂O. Lahus loksutatakse ettevaatlikult mittepeptiidse produktide paremaks lahustamiseks Et₂O-s. Veekiht pestakse Et₂O-ga veel 2-3 korda. Järgmiselt veekiht külmutatakse ja lüofiliseeritakse toorpeptiidi saamiseks.

KT lahused:

- 0,5 g ninhüdrini 10 ml EtOH-s
- 4 g fenooli 1 ml EtOH-s

Vabade aminorühmade atsüülimiseks kasutatud lahus:

- 0,1 g HOBt
- 1,125 ml DiPEA
- 2,8 ml Ac₂O
- Viidi lahuse ruumala DCM-ga kuni 25 ml

Antud töös kasuti Rink Amide MBHA tahket kandjat (funktsionaalrühmade hulk 0,68 mmol/g) ja Fmoc/*t*Bu-strateegiat. Kõik sünteesitud peptiidid on C-terminaalsed amiidid. Aktivaatoritena kasutati HOBt ja TBTU koos DiPEA-ga. Üldjuhul kasutati 3 ekv aminohapet ja aktivaatoreid ning 6 ekv alust.

Nii puhastamata kui ka puhastatud peptiidid analüüsiti HPLC-MS abil, integreerides spektreid UV 220 nm juures ja tehes kindlaks nende struktuure ja molekulmasse MS spektrite põhjal. Peptiidid puhastati preparatiivse HPLC-ga, fraktsioonid analüüsiti MS abil, valati kokku puhtamaid ja lüofiliseeriti.

3.4.2. Varulahuste kontsentratsiooni määramine UV-Vis spektroskoopia abil

Sünteesitud peptiididest valmistati ca 15 mM varulahused MOPS puhvril (20 mM MOPS, 50 mM NaCl, pH = 7.0), lähtudes kaalutistest. Enne kaalumist peptiide lüofiliseeriti vähemalt kahe ööpäeva jooksul.

Tegelike kontsentratsioonide määramiseks kasutati Aitken ja Learmonth poolt välja pakutud meetodit (Aitken ja Learmonth, 2009). Selle järgi võeti igast varulahusest alikvoodid orienteeruva kontsentratsiooniga 1 mg/ml ja valmistati neist alglahused kontsentratsiooniga 0,4 mg/ml, samuti MOPS puhvris. Kõik järgmised lahused (0,3; 0,2; 0,1; 0,05; 0,025 mg/ml) valmistati lahjendamise teel. Absorbtsioonspektrid määrati ES kvartsküvetis 25°C juures. Referentslahusena kasutati MOPS puhvrit. Spektrid registreeriti vahemikus 190-300 nm.

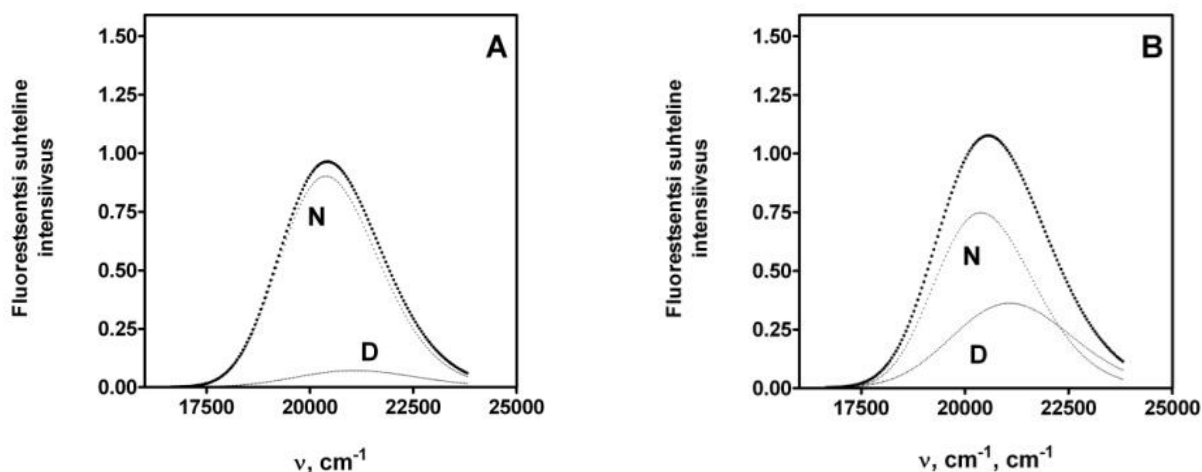
Kontsentratsioonid arvutati, kasutades järgmist empiirilist valemit:

$$C \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} = 144(A_{215} - A_{225}) \quad (4)$$

kus 144 on empiiriline neelduvuse koefitsient ning A_{215} ja A_{225} on neelduvused vastavalt 215 ja 225 nm juures.

3.4.3. Fluorestsentspektrite analüüs

Fluorestsentspektrid registreeriti digitaalselt ja andmed kanti spektromeetrilt üle andmetöötluks kasutatud arvutisse ja teisendati lainearvu kasutavasse spektri formaati. Andmete töötlus toimus meie laboris loodud algoritmi abil, mis lahutab mitmest komponendist koosneva näiva fluorestsentspektri alakomponentideks, mis iseloomustavad erinevatele valgu seisunditele vastavaid spektreid. Selleks modelleeritakse fluorestsentsi spektrit log-normaalsete jaotuskõverate summaga ning selle meetodi põhimõtted kirjeldatud mitmetes töödes (Kalauzi *et al.*, 2007). Analüüsiks kasutati eelnevalt parametrizeeritud funktsiooni, mille abil määrati valgu erinevate seisundite fraktsiooniline sisaldus. Sellise andmetöötlu tulemusena määrati natiivsele ensüümile vastava fraktsiooni hulk ja selle suuruse ajalisest muutusest lähtudes konstrueeriti kineetilised kõverad. Näited spektrite lahutamise kohta on toodud **Joonisel 4**.



Joonis 4. PKAc molekuliga seotud akrilodaani fluorestsentspekttri muutus valgu denaturatsioonis. Spekter A (tugevam joon) on võetud 1 min peale denaturatsiooni algust ja selle lahutamisel komponentideks on võimalik määrata N ja D seisundite osa. Spekter B (tugev joon) on võetud 20 min peale denaturatsiooni algust. Näha on natiivse valgu (N) kontsentratsiooni muutus.

3.4.4. PKAc denaturatsiooni kineetika

Denaturatsiooni jälgiti MOPS puhvris. Eelnevate uuringute põhjal kasutati 20 mM MOPS puhvrit, kuhu lisati 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂ (pH = 7.0, 25°C). Inhibiitoripeptiidide kontsentratsioonid katsetes olid vahemikus 10 µM kuni 500 µM, sõltuvalt inhibiitoripeptiidist. Reaktsioon initsieeriti 50 nM akrilodaaniga märgitud PKAc lisamisega reaktsioonisegusse ja esimene spekter võeti ca 15 s pärast. Iga mõõtmispäeva alguses ja lõpus mõõdeti valgu denaturatsiooni kineetikat ilma inhibiitori juuresolekuta. Spektrite analüüsil määrati natiivse ensüümi fraktsiooni suurus f^N ja teljestikus aeg vs f^N konstrueeriti kineetilised kõverad.

Kineetilistest kõveratest arvutati kiiruskonstandid, kasutades eksponentsiaalset kiiruse võrrandit:

$$f_t = f_0 + \Delta f e^{-k_{obs}t} \quad (5)$$

kus f_t on fluorestsentsi intensiivsus ajahetkel t , f_0 on fluorestsents ajahetkel $t=0$, t on aeg ja k_{obs} on näiv kiiruskonstant.

4. Tulemused ja arutelu

4.1. Sünteesitud inhibiitorpeptiidid

Käesolevas töös sünteesiti peptiidid C-terminaalsete amiididena. Kokku sünteesiti 6 peptiidi ning need puhastati preparatiivse HPLC meetodil. Peptiide iseloomustati analüütilise HPLC meetodi abil, kasutades UV detektorit ja lainepikkust 220 nm. Sellisel viisil iseloomustatud põhifraktsiooni hulgast lähtudes arvutati ka produkti kromatograafiline puhtus. Andmed on esitatud **Tabelis 2**.

Tabel 2. Sünteesitud peptiidide saagised, puhastatud peptiidide kaalutised ja puhtused.

Lühend	Peptiidi järjestus	Põhiprodukti sisaldus enne puhastamist, LC 220 nm	Puhastatud peptiidi hulk, mg	Peptiidi puhtus, LC 220 nm
PKI1	TGRRNAI-NH ₂	70%	12,8	90%
PKI2	GRTGRRNAI-NH ₂	20%	21,6	95%
PKI2*	GRTLRRNAI-NH ₂	10%	4,8	85%
PKI3	DFIASGRTGRRNAI-NH ₂	59%	17,6	88%
PKI4	YADFIASGRTGRRNAI-NH ₂	43%	9,3	87%
PKI5	TTYADFIASGRTGRRNAI-NH ₂	58%	10,1	89%

Peptiidid identifitseeriti, lähtudes nende massispektritest. Kuna ioniseerimiseks kasutati ESI allikat positiivses režiimis, siis detekteeriti erineval moel protoneeritud molekulaarioonid. PKI2 – PKI5 järjestustes on kolm R, seega nad esinesid ühe-, kahe- ja kolmekordselt protoneeritud molekulaarioonidena. PKI1 järjestuses on vaid kaks R, seega esinesid ainult ühe- ja kahekordselt protoneeritud molekulaarioonid. Lisaks esinesid ka ühe või kahe TFA jääki sisaldavad molekulaarioonid. Andmed on toodud **Tabelis 3**.

Puhastatud peptiidide kromatogrammid ja massispektrid on toodud Lisas.

Tabel 3. Peptiidide massispektrites esinenud m/z-suhed, mis vastavad kindlatele molekulaarioonidele.

Lühend	$[M + H]^+$	$[M + 2H]^{2+}$	$[M + H + TFA]^+$	$[M + 2H + TFA]^{2+}$	$[M + 3H]^{3+}$	$[M + H + 2TFA]^+$
PKI1	784	394	899	-	-	-
PKI2	998	501	-	557	334	1229
PKI2*	1056	529	1171	585	352	1286
PKI3	-	765	-	821	512	-
PKI4	-	882	-	940	589	-
PKI5	-	984	-	1042	656	-

4.2. Varulahuste kontsentratsioonid

Sünteesitud peptiididest valmistati ca 15 mM varulahused, lähtudes aine kaalutisest. Aga kuna on tegemist küllaltki hüdrofiilsete peptiididega, mis lihtsasti seovad vett, mida ei ole võimalik eemaldada lüofiliseerimisel. Peale selle on produkti koostises ka TFA jäägid ning ilmselt ka muud puhvri ioonid. Seetõttu määrati lahuste tegelikud kontsentratsioonid UV-Vis spektromeetri abil.

Aitken ja Learmonth poolt väljapakutud määramismeetodi põhimõte seisneb peptiidsideme neelduvuse määramises ja põhineb Lambert-Beeri seaduspärasusel: neelduvuse intensiivsus on lineaarses sõltuvuses aine kontsentratsioonist (Aitken ja Learmont, 2009). Meetod ei nõua sisestandardi kasutamist ega kalibreerimiskõvera koostamist. Samuti ei nõua see meetod ka Y, W, F või S-S sidemete esinemist peptiidi järjestuses. See võimaldab määrata ka nende peptiidide neelduvust, mis ei oma spetsiifilist neelduvuskoefitsienti.

Peptiidsideme neelduvus on intensiivsem 190 nm juures, aga selles piirkonnas neelavad tugevalt ka teised ained. Seega on õigustatud pikemate lainepikkuste neelduvuste kasutamine. Kasutatud töös on soovitatud teha mõõtmisi 215 ja 225 nm juures. Neid lainepikkusi kasutati ka selles töös, lähudes empiirilisest neelduvuskoefitsiendist 144. MOPS puhvri enda neelduvus on minimaalne antud lainepikkuste juures ning see neelduvus lahutati spektritest võrdluslahuse kasutamise meetodil.

Kasutatud inhibiitorpeptiidide varulahuste määratud kontsentratsioonid on esitatud **Tabelis 4:**

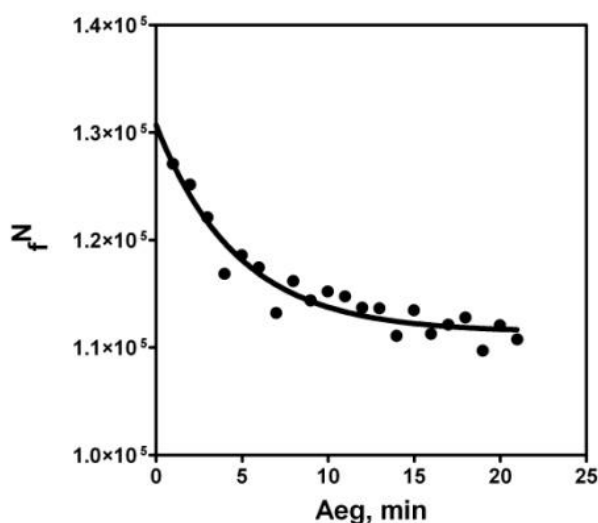
Tabel 4. Kasutatud inhibiitorpeptiidide varulahuste kontsentratsioonid.

Lühend	Peptiidi järjestus	Kontsentratsioon*, mM
PKI1	TGRRNAI-NH ₂	4,06
PKI2	GRTGRRNAI-NH ₂	3,69
PKI2*	GRTLRRNAI-NH ₂	3,79
PKI3	DFIASGRTGRRNAI-NH ₂	7,61
PKI4	YADFIASGRTGRRNAI-NH ₂	5,48
PKI5	TTYADFIASGRTGRRNAI-NH ₂	4,28

*Kontsentratsiooni suhteline viga ei ületanud 5%

4.3. Valk-ligand komplekside dissotsiatsioonikonstantide määramine.

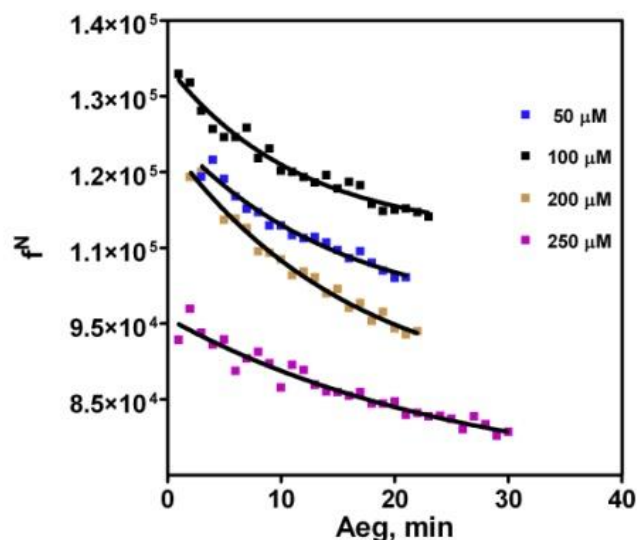
Natiivse valgu denaturatsiooni kirjeldab **Joonisel 5** toodud kineetiline kõver, mis vastab eksponentsiaalsele kiiruse **võrrandile 1**. Selle võrrandi järgi saadi kiiruskonstandi k_{obs} väärtuseks $0.18 \pm 0.04 \text{ min}^{-1}$. See väärtus loeti võrdseks kiiruskonstandiga k_d (**võrrand 3**) ja seda kasutati peptiidi sidumise arvutustel.



Joonis 5. Natiivse valgu denaturatsiooni kineetika MOPS puhvis (20 mM MOPS, 50 mM NaCl, pH = 7.0, 25°C).

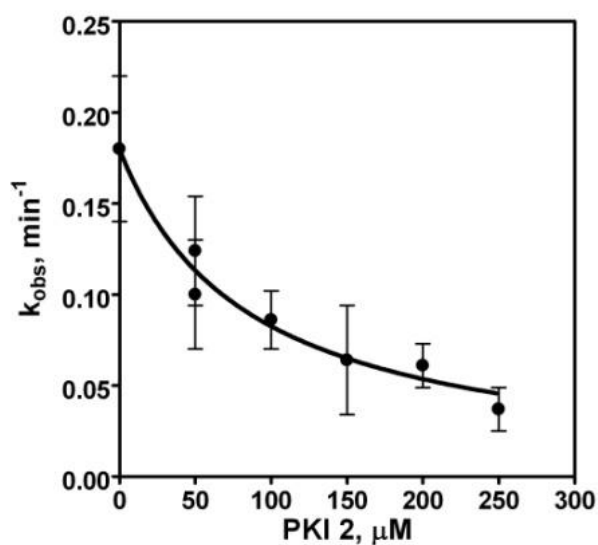
Katseid selle konstandi määramiseks tehti igal katsepäeval mõõtmiste seeria alguses ja lõpus ning sellel teel kontrolliti määramiseks kasutatava süsteemi toimimist.

Ligandide sidumise kirjeldamiseks määrati k_{obs} väärtused sünteesitud peptiidide erinevatel kontsentratsioonidel (**Joonis 6**) ja saadud kineetilistest kõveratest arvutati kiiruskonstandid.



Joonis 6. Natiivse valgu denaturatsiooni kineetika inhibiitorpeptiidi PKI2 erinevate kontsentratsioonide juuresolekul. Katse tingimused samad, mis **Joonisel 4**.

Peptiidi PKI2 juuresolekul määratud kiiruskonstante analüüsi teljestikus peptiidi kontsentratsioon vs k_{obs} ning **võrrandi 3** abil arvutati vastavad K_L väärtused.



Joonis 7. Inhibiitorpeptiidi PKI2 mõju akrüloodaaniga märgitud PKAc denaturatsiooni kiiruskonstantidele.

Teiste inhibiitorpeptiidide juuresolekul mõõdetud valgu denaturatsiooni kiiruskonstandid k_{obs} on toodud töö lisas Lisas.

Ensüümi denaturatsiooni kineetika katsetest määratud ensüümi ja ligandi komplekside dissotsiatsioonikonstandid K_L on esitatud **Tabelis 5**. Määratud K_L väärtustest on näha, et üldjuhul

mida pikem on inhibiitorpeptiid, seda parem on tema sidumine ensüümiga. Erand on PKI2*, mis kujundab endast modifitseeritud järjestusega inhibiitorit.

Tabel 5. Konstandid K_i , K_L ja neist välja arvutatud parameeter α .

Peptiidi	Peptiidi järjestus	K_i <small>Cheng <i>et al.</i>, 1985</small>	K_L	α
PKI1	TGRRNAI-NH ₂	1500 nM	267,8 ± 79,4 µM	5,60·10 ⁻³
PKI2	GRTGRRNAI-NH ₂	390 nM	85,0 ± 11,5 µM	4,59·10 ⁻³
PKI2*	GRTLRRNAI-NH ₂	36 nM	29,3 ± 13,0 µM	1,23·10 ⁻³
PKI3	DFIASGRTGRRNAI-NH ₂	97 nM	61,9 ± 24,4 µM	1,57·10 ⁻³
PKI4	YADFIASGRTGRRNAI-NH ₂	28 nM	18,5 ± 1,2 µM	1,51·10 ⁻³
PKI5	TTYADFIASGRTGRRNAI-NH ₂	3,1 nM	11,9 ± 4,2 µM	2,61·10 ⁻⁴

4.4. Allosteerilised efektid

Tabeli 5 andmetest on näha, et ATP juuresolekul on peptiidide sidumine PKAc aktiivtsentriga oluliselt tugevam, kui ilma selle ligandita. Seega võib andmete kvalitatiivsel võrdlemisel järeldada, et ATP põhjustab allosteerilist efekti, muutes peptiidide sidumist.

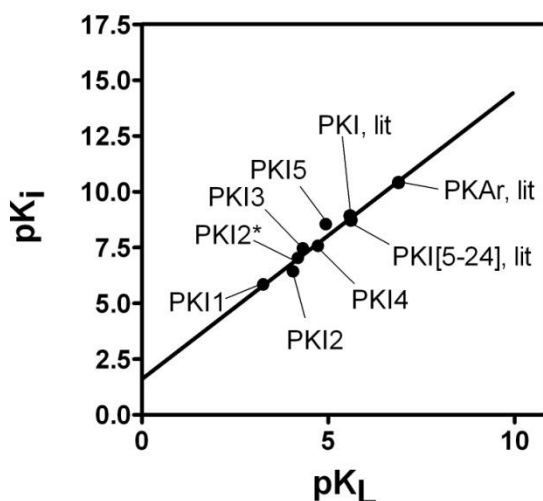
Akrülodaaniga märgistatud PKAc ja inhibiitorpeptiidide seostumisel esinevat allosteerilist efekti α määrati dissotsiatsioonikonstantide K_i ja K_L suhtest.

$$\alpha = \frac{K_i}{K_L} \quad (6)$$

Seejuures on konstandid K_i väärtused on määratud teiste autorite poolt ja kirjeldavad samade peptiidide inhibeerivat toimet PKAc substraatreaktsioonile tingimustes, kus ensüüm on küllastatud ATP-ga.

Tabelist 5 on näha, et parameetri α väärtused on ühest väiksemad. See tähendab positiivset allosteeriat ehk seda, et ühe ligandi sidumise tulemusena muutub ensüümi konformatsion nii, et ta soodustab teise ligandi sidumist. Teisisõnu toimub ATP juuresolekul ensüüm-ligand kompleksi stabilisatsioon.

Selleks, et näidata erinevate inhibiitorpeptiidide dissotsiatsioonikonstantide omavahelist seost sidumisel ilma ATP osavõtuta ja sidumisel ATP juuresolekul koostati graafik telgedes pK_L vs pK_i . Graafikule lisati ka andmed kolme varem uuritud peptiidi jaoks, mille sidumist on määratud ka ilma ATP juuresolekuta. Viited neile töödele on toodud **Joonis 8**. selgituses. Osutub, et need andmed on kooskõlas antud töös saadud tulemustega.



Joonis 8. Inhibiitorpeptiidide jaoks määratud parameetrite pK_L ja pK_i võrdlus PKAc jaoks. PKI1 kuni PKI5 on käesolevas töös uuritud peptiidid. Peptiidide PKI[5-24] ja PKI jaoks ning PKAr (PKA regulatoorne alaühik) jaoks on valk-ligand kompleksi dissotsiatsioonikonstandid määratud kirjanduses:

PKAr ehk PKA regulatoorne alaühik – Herberg and Taylor, 1993;

PKI - Herberg and Taylor, 1993;

PKI[5-24] - Cheng *et al*, 1985.

Kokkuvõttes võib märkida, et ATP juuresolekul paraneb oluliselt peptiidide sidumine proteiinkinaas A aktiivtsentris ning seda efekti iseloomustab sõltuvus pK_i ja pK_L vahel:

$$pK_i = (1,3 \pm 0,1)pK_L + (1,6 \pm 0,5) \quad (7)$$

Seega võimaldab tehtud analüüs kirjeldada allosteerilist efekti mitte ainult kvalitatiivselt, vaid ka kvantitatiivselt.

5. Kokkuvõte

Käesolevas töös sünteesiti kuus cAMP-st sõltuva proteiinkinaasi A aktiivsust inhibeerivat peptiidi. Nende peptiidide järjestused on tuletatud PKA termostabiilse inhibiitori PKI struktuurist. Peale struktuuri identifitseerimist ja peptiidide puhastamist määrati nende peptiidide ensüümiga sidumise efektiivsus ilma ATP juuresolekuta, kasutades meie laboratooriumis välja töötatud spektrofluorimeetrilist meetodit.

Saadud tulemusi võrreldi samade inhibiitorpeptiidide jaoks varem määratud inhibeerimiskonstantidega, mis kirjeldavad nende inhibiitorite sidumist ensüümiga tingimustes, kus see on küllastatud ATP poolt. Selline võrdlus võimaldab iseloomustada peptiidide sidumisel ilmnevat allosteerilist efekti, kus teiseks allosteerikat põhjustavaks ligandiks on ATP.

Allosteerilise efekti suurust iseloomustati allosteerika parameetri α abil, mille väärtus arvutati suhtest K_L/K_i . Antud töös on iga inhibiitorpeptiidi jaoks välja arvutatud parameetri α väärtus ühest väiksem, mis tähendab positiivse allosteerilise efekti olemasolu. Seega töö tulemused näitasid, et ATP juuresolek stabiliseerib oluliselt ensüüm-ligand kompleksi ning arvutati selle stabilisatsiooni suurus erinevate peptiidide jaoks.

6. Summary

Karina Solovjova

Interaction of inhibitory peptides with acrylodan labelled cAMP-dependent protein kinase A catalytic subunit

Six inhibitory peptides for cAMP-dependent protein kinase A were synthesized and their interactions with the enzyme were studied. Dissociation constants for enzyme-peptide complexes were determined by using spectrofluorimetric method. Acrylodan-labelled protein was used in these measurements. Author is thankful for providing this sample from MSc Rait Kivi.

The measurements were made by monitoring kinetics of denaturation process of acrylodan-labelled protein in 20 mM MOPS buffer. This process was accompanied significant blueshift of fluorescence spectra that was detected in experiments. In the presence of inhibitory peptides the denaturation rate decreased in dose-dependent manner and these dependences were used to calculate the dissociation constants K_L . This constant were compared with inhibition constants K_i of PKAc by the same peptides, measured by Cheng et al (Cheng *et al.*, 1985). This comparison revealed that the K_i values were always significantly lower than the K_L values. The difference between K_i and K_L values can be explained proceeding from the understanding that peptide binding in the presence of ATP is enhanced by allosteric effect of the second ligand. The allosteric effect was quantified by free energy relationship between the pK_i and pK_L constants.

7. Tänuavaldus

Soovin südamest tänada oma juhendajat Jaak Järve, kes aitas kaasa selle töö valmimisele kõigi oma teadmistega. Samuti soovin tänada Piret Arukuuske ja Julia Uusnat, kes aitas mind peptiidsünteesi alal, ja Gerda-Johanna Raidaru tema õpetuse eest kromatograafia kohta.

Avaldan ka kõige suuremat tänu Rait Kivile, kelle valmistas antud töös kasutatud PKAc-Acr ja kelle metoodikat kasutasin. Südamlikud tänud ka Ivo Leitole, Anneli Kruvele ja Kadri Ligile, kes aitasid mind spektrofleurimeetria alastes katsetes.

Täna ka kõiki teisi orgaanilise ja bioorgaanilise keemia õppetoolide töötajaid mõistva ja sõbraliku suhtumise eest.

Kindlasti tahan tänada ka oma vanemaid ja kasse, kelle armastus ja toetus aitasid mind ning selle töö valmimist.

8. Kasutatud kirjandus

Acosta, G. A., del Fresno, M., Paradis-Bas, M., Rigau-DeLlobet, M., Cote, S., Royoa, M., Albericio, F. (2009) Solid-phase peptide synthesis using acetonitrile as a solvent in combination with PEG-based resins. *J Pept Sci*, **15**, 629–633.

Aitken, A., Learmonth, M. P. (2009) Protein Determination by UV Absorption. Kus: Waler J. M. Ed. *The Protein Protocols Handbook*. Totowa, NJ: Humana Press Inc, 3-6.

Al-Warhi, T. I., Al-Hazimi, H. M. A., El-Faham, A. (2012) Recent development in peptide coupling reagents. *J Saudi Chem Soc*, **16**, 97–116.

Benoiton, N. L., Lee Y. C., Steinaur, R., Chen, F. M. (1992) Studies on sensitivity to racemization of activated residues in couplings of N-enzyloxycarbonyldipeptides. *Int J Pept Protein Res*, **40**, 559-66.

Bogoyevitch, M. A., Barr, R. K., Kettermann, A. J. (2005) Peptide inhibitors of protein kinases —discovery, characterisation and use. *Biochim Biophys Acta*, **1754**, 79-99.

Carpino, L. A., Ghassemi, S., Ionescu, D., Ismail, M., Sadat-Aalae, D., Truran, G. A. Mansour, E. M. E., Siwruk, G. A., Eynon, J. S., Morgan, B. (2003) Rapid, continuous solution-phase peptide synthesis: application to peptides of pharmaceutical interest. *Org Process Res Dev*, **7**, 28-37.

Cheetham, G. M. (2004) Novel protein kinases and molecular mechanisms of autoinhibition. *Curr Opin Struct Biol*, **14**, 700-705.

Cheng, H.-C., Kemp, B. E., Pearson, R. B., Smith, A. J., Misconi, L., Van Patten, S. M., and Walsh, D. A. (1986) A potent synthetic peptide inhibitor of the cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem*, **261**, 989-992 .

Choi, B., Zocchi, G. (2006) Mimicking cAMP-dependent allosteric control of protein kinase A through mechanical tension. *J Am Chem Soc*, **128**, 8541-8548.

Cui, Q., Karplus, M. (2008) Allostery and cooperativity revisited. *Protein Sci*, **17**, 1295–1307.

Dick, F. (1994) Acid cleavage/deprotection in Fmoc/tBu solid-phase peptide synthesis. Kus: Pennington, M., Dunn, B. Eds. *Peptide Synthesis Protocols: Methods in Molecular Biology*, Vol 35. Totowa, NJ: Humana Press Inc, 63-72.

Diskar, M., Zenn, H.-M., Kaupisch, A., Kaufholz, M., Brockmeyer, S., Sohmen, D., Berrera, M., Zaccolo, M., Boshart, M., Herberg, F. W., Prinz, A. (2010) Regulation of cAMP-

dependent protein kinases: the human protein kinase X (PrKX) reveals the role of the catalytic subunit α H- α I loop. *J Biol Chem*, **285**, 35910–35918.

Doskeland, S. O., Maronde, E., Gjertsen, B. T. (1993) The genetic subtypes of cAMP-dependent protein kinase - functionally different or redundant? *Biochim Biophys Acta*, **1178**, 249-258.

Dourtoglou, V., Gross, B., Lambropoul, V., Ziodrou, C. (1984) O-Benzotriazolyl-N,N,N',N'-tetramethyluronium hexafluorophosphate as coupling reagent for the synthesis of peptides of biological interest. *Synthesis*, 572-574.

Engh, R. A., Girod, A., Kinzel, V., Huber, R., Bossemeyer, D. (1996) Crystal structures of catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase in complex with isoquinolinesulfonyl protein kinase inhibitors H7, H8, and H89. *J Biol Chem*, **271**, 26157–26164.

Garcia Martin, F., Albericio, F. (2008) Solid supports for the synthesis of peptides. From the first resin used to the most sophisticated in the market. *Chim Oggi*, **26**, 29-34.

Gawne, G., Kenner, G. W., Sheppard, R. C. (1969) Acyloxyphosphonium salts as acylating agents. Synthesis of peptides. *J Am Chem Soc*, **91**, 5670.

Guzmán, F., Barberis, S., Illanes A. (2007) Peptide synthesis: chemical or enzymatic. *Electron J Biotechn*, **10**, 2.

Herberg, F. W., Taylor, S. S. (1993) Physiological inhibitors of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase: effect of MgATP on protein-protein interactions. *Biochemistry*, **32**, 14015-14022.

Hidaka, H., Inagaki, M., Kawamoto, S., Sasaki, Y. (1984) Isoquinolinesulfonamides, novel and potent inhibitors of cyclic nucleotide dependent protein kinase and protein kinase C. *Biochemistry*, **23**, 5036-5041.

Ho, M., Bramson, H. N., Hansen, D. E., Knowles, J. R., Kaiser, E. T. (1988) Stereochemical course of the phospho group transfer catalyzed by cAMP-dependent protein kinase. *J Am Chem Soc*, **110**, 2680-2681.

Hojo, K., Hara, A., Kitai, H., Onishi, M., Ichikawa, H., Fukumori, Y., Kawasaki, K. (2011) Development of a method for environmentally friendly chemical peptide synthesis in water using water-dispersible amino acid nanoparticles. *Chem Cent J*, **5**, 49.

Isidro-Llobet, A., Alvarez, M., Albericio, F. (2009) Amino acid-protecting groups. *Chem Rev*, **109**, 2455–2504.

Jad, Y. E., Acosta, G. A., Khattab, S. N., de la Torre, B. G., Govender, T., Kruger, H. G., El-Faham, A., Albericio, F. (2015) Peptide synthesis beyond DMF: THF and ACN as excellent and friendlier alternatives. *Org Biomol.Chem*, **13**, 2393-2398.

Johnson, D. A., Akamine, P., Radzio-Andzelm, E., Madhusudan, M., Taylor, S. S (2001) Dynamics of cAMP-Dependent Protein Kinase. *Chem Rev*, **101**, 2243–2270.

Kaiser, E., Colescot, R. L., Bossinge, C. D., Cook, P. I. (1970) Color test for detection of free terminal amino groups in solid-phase synthesis of peptides. *Anal Biochem*, **34**, 595-598.

Kalauzi, A., Mutavdžić, D., Djikanović, D., Radotić, K., Jeremić, M. (2007) Application of asymmetric model in analysis of fluorescence spectra of biologically important molecules. *J Fluoresc*, **17**, 319-29.

Kim C., Cheng, C. Y., Saldanha, S. A., Taylor, S. S. (2007) PKA-I holoenzyme structure reveals a mechanism for cAMP-dependent activation. *Cell*, **130**, 1032-1043.

Kivi, R., Jemth, P., Järv, J. (2013) Kinetics of acrylodan-labelled cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit denaturation. *Protein J*, **32**, 519–525.

Knighton, D. R., Zheng, J. H., Ten Eyck, L. F., Ashford, V. A., Xuong, N. H., Taylor, S. S. Sowadski, J. M. (1991) Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science*, **253**, 407-414.

Koshland, D. E., Nemethy, G., Filmer, D. (1966) Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits. *Biochemistry*, **5**, 365-385.

Kübler, D., Walter Pyerin, Bill, O., Hotz, A., Sonka, J., Kinzel, V. (1989) Evidence for ecto-protein kinase activity that phosphorylates Kemptide in a cyclic AMP-dependent mode. *J Biol Chem*, **264**, 14549-14.

Kuznetsov, A. (2009) *Allosteric effects in reactions catalyzed by the cAMP-dependent protein kinase A catalytic subunit*. PhD dissertatsioon, Tartu Ülikool

Kuznetsov, A., Järv, J. (2008) Single-subunit allostery in the kinetics of peptide phosphorylation by protein kinase A. *P Est Acad Sci.*, **54**, 247–254.

Lauze E., Stoelcker B., Luca F. C., Weiss E., Schutz A. R., Winey M. (1995). Yeast spindle pole body duplication gene MPS1 encodes an essential dual specificity protein kinase. *EMBO J*, **14**, 1655–63.

Lew, J., Coruh, N., Tsigelny, I., Garrod, S., Taylor, S. S. (1997) Synergistic binding of

nucleotides and inhibitors to cAMP-dependent protein kinase examined by acrylodan fluorescence spectroscopy. *J Biol Chem*, **272**, 1507–1513.

Lloyd-Williams, P., Albericio, F., Giralt, E. (1997) *Chemical approach to the synthesis of peptides and proteins*. USA: Boca Raton.

Mäde, V., Els-Heindl, S., Beck-Sickinger, A. G. (2014) Automated solid-phase peptide synthesis to obtain therapeutic peptides. *Beilstein J Org Chem*, **10**, 1197–1212.

Masterson, L. R., Mascioni, A., Traaseth, N. J., Taylor, S. S., Veglia, G. (2008) Allosteric cooperativity in protein kinase A. *Proc Natl Acad Sci*, **105**, 506-511.

Merrifield, R. B. (1963) Solid phase peptide synthesis. 1. The synthesis of tetrapeptide. *J Am Chem Soc*, **85**, 2149.

Nishiuchi, Y., Inui, T., Nishio, H., Bodi, J., Kimura, T., Tsuji, F. I., Sakakibara S. (1998) Chemical synthesis of the precursor molecule of the Aequorea green fluorescent protein, subsequent folding, and development of fluorescence. *Proc Natl Acad Sci*, **95**, 13549–13554.

Pedersen, S. L., Tofteng, A. P., Malik, L., Jensen, K. E. (2012) Microwave heating in solid-phase peptide synthesis. *Chem Soc Rev*, **41**, 1826–1844.

Pennington, M. (1994) HF cleavage and deprotection procedures for peptides synthesized using a Boc/Bzl strategy. Kus: Pennington, M., Dunn, B. Eds. *Peptide Synthesis Protocols: Methods in Molecular Biology*, Vol 35. Totowa, NJ: Humana Press Inc, 47-62.

Pinna, L. A., Ruzzene, M. (1996) How do protein kinases recognize their substrates? *Biochim Biophys Acta*, **1314**, 191-225.

Prendergast, F. G., Meyer, M., Carlson, G. L., Iida, S., Potter, J. D. (1983) Synthesis, spectral properties, and use of 6-acryloyl-2-dimethylaminonaphthalene (acrylodan): a thiol-selective, polarity-sensitive fluorescent probe. *J Biol Chem*, **25**, 7541-7544.

Ricouart, A., Gesquiere, J. C., Tartar, A., Sergheraert, C. (1991) Design of potent protein kinase inhibitors using the bisubstrate approach. *J Med Chem*, **34**, 73-78.

Schegg, K.M., Denslow, N.D., Andersen, T.T., Bao, Y., Cohen, S.A., Mahrenholz, A.M., Mann, K. (1997) Quantitation and identification of proteins by amino acid analysis: ABRF-96AAA Collaborative Trial. Kus: Marshak, D. R., Ed. *Techniques In Protein Chemistry VIII*. Academic Press, 207-216.

Seitz, O. (1998) New protecting group strategies for the solid-phase synthesis and

modification of peptides, oligonucleotides, and oligosaccharides. *Angew Chem Int Ed*, **37**, 3109-3111.

Shchemelinin, I., Šefc, L., Nečas, E. (2006) Protein kinases, their function and implication in cancer and other diseases. *Folia Biol (Praha)*, **52**, 81-101.

Sheehan, J. C., Hess, G. P. (1955) A new method of forming peptide bonds. *J Am Chem Soc*, **77**, 1067–1068.

Shoji S., Ericsson L. H., Walsh K. A., Fischer E. H., Titani K. (1983) Amino acid sequence of the catalytic subunit of bovine type II adenosine cyclic 3',5'-phosphate dependent protein kinase. *Biochemistry*, **22**, 3702-3709.

Smith, J. B. (2001) Peptide Sequencing by Edman Degradation. Kus: *Encyclopedia of life sciences*. MacMillan Publishers Ltd, Nature Publishing Group, www.els.net.

Taylor S. S., Kim C., Vigil D., Haste N. M., Yang J., Wu J., Anand G. S. (2005) Dynamics of signaling by PKA. *Biochim Biophys Acta*, **1754**, 25-37.

Taylor, S. S., Yang, J., Wu, J., Haste, N. M., Radzio-Andzelm, E., Anand, G. (2004) PKA: a portrait of protein kinase dynamics. *Biochim Biophys Acta*, **1697**, 259-269.

Thullner, S., Gesellchen, F., Wiemann., S., Pyerin, W., Kinzel, V., Bossemeyer, D. (2000) The protein kinase A catalytic subunit C β 2: molecular characterization and distribution of the splice variant. *Biochem J*, **351**, 123-132.

Thundimadathil, J., Gangakhedkar, A. (2014) Improving stability of peptide drugs through chemical modifications. *Chim Oggi*, **32**, 35-38.

Tietze, A. A, Pascal Heimer, P., Stark, A., Imhof, D. (2012) Ionic liquid applications in peptide chemistry: synthesis, purification and analytical characterization processes. *Molecules*, **17**, 4158-4185.

Ubersax, J. A., James E. Ferrell, J. E. (2007) Mechanisms of specificity in protein phosphorylation. *Nat Rev Mol Cell Bio*, **8**, 531-541.

Vojkovsky, T. (1995) Detection of secondary amines on solid phase. *Pept Res*, **8**, 236-237.

White, P., Keyte, J. W., Bailey, K., Bloomberg, G. (2004) Expediting the Fmoc solid phase synthesis of long peptides through the application of dimethyloxazolidine dipeptides. *J Peptide Sci*, **10**, 18-26.

Wiley, J. C., Wailes, L. A., Idzerda, R. L., McKnight, S. G. (1999) Role of regulatory subunits and protein kinase inhibitor (PKI) in determining nuclear localization and activity of the catalytic subunit of protein kinase A. *J Biol Chem*, **274**, 6381–6387.

Zetterqvist, O., Ragnarsson, U. (1982) The structural requirements of substrates of cyclic AMP-dependent protein kinase. *Febs Lett*, **139**, 287-290.

Lisad

Akrüloodaaniga märgistatud PKAc denaturatsiooni kiiruskonstandid inhibiitorpeptiidide juuresolekul

PKI1, TGRRNAI-NH₂

C, μM	100	200	300	400	500
k_{obs} , min^{-1}	0,14	0,13	0,10	0,060	0,040
σ	0,025	0,030	0,020	0,010	0,010

PKI2, GRTGRRNAI-NH₂

C, μM	50	50	100	150	200	250
k_{obs} , min^{-1}	0,10	0,12	0,087	0,064	0,061	0,038
σ	0,049	0,030	0,016	0,036	0,012	0,013

PKI2*, GRTLRRNAI-NH₂

C, μM	30	50	70
k_{obs} , min^{-1}	0,12	0,058	0,033
σ	0,040	0,013	0,0085

PKI3, DFASGRTGRRNAI-NH₂

C, μM	10	25	50	100	200
k_{obs} , min^{-1}	0,14	0,15	0,13	0,040	0,032
σ	0,056	0,034	0,045	0,0097	0,0050

PKI4, YADFASGRTGRRNAI-NH₂

C, μM	25	50	100
k_{obs} , min^{-1}	0,077	0,055	0,038
σ	0,032	0,021	0,023

PKI5, TTYADFASGRTGRRNAI-NH₂

C, μM	10	25	50	100
k_{obs} , min^{-1}	0,071	0,071	0,047	0,034
σ	0,020	0,027	0,020	0,021

Puhastatud inhibiitorpeptiidide kromatogrammid ja MS spektrid

Lühend	Peptiidi järjestus
PKI1	TGRRNAI-NH ₂
PKI2	GRTGRRNAI-NH ₂
PKI2*	GRTLRRNAI-NH ₂
PKI3	DFIASGRTGRRNAI-NH ₂
PKI4	YADFIASGRTGRRNAI-NH ₂
PKI5	TTYADFIASGRTGRRNAI-NH ₂

PKI 1: TGRRNAI-NH₂ Purity

Sample Name : Karina PKI1
 Sample ID : PKI1 purity test
 Data Filename : karina34.lcd
 Method Filename : gerda1uus.lcm
 Batch Filename :
 Vial # : -1
 Injection Volume : 20 uL
 Date Acquired : 9.04.2015 12:59:30
 Date Processed : 18.04.2015 23:38:39

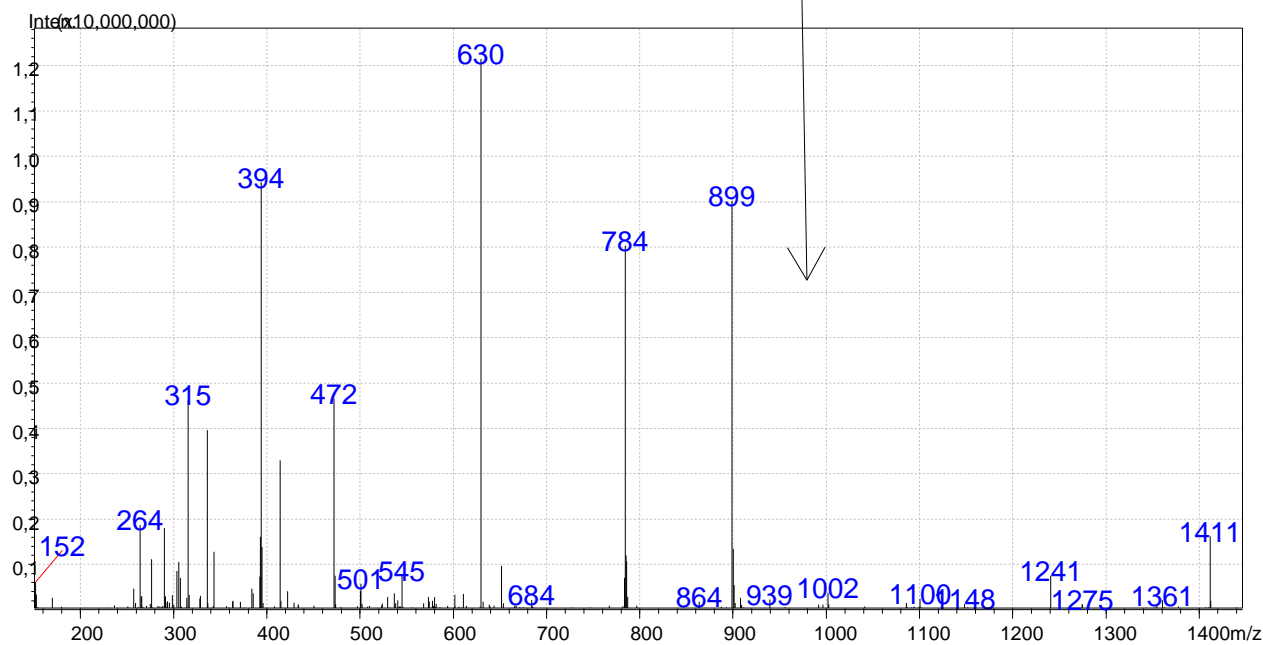
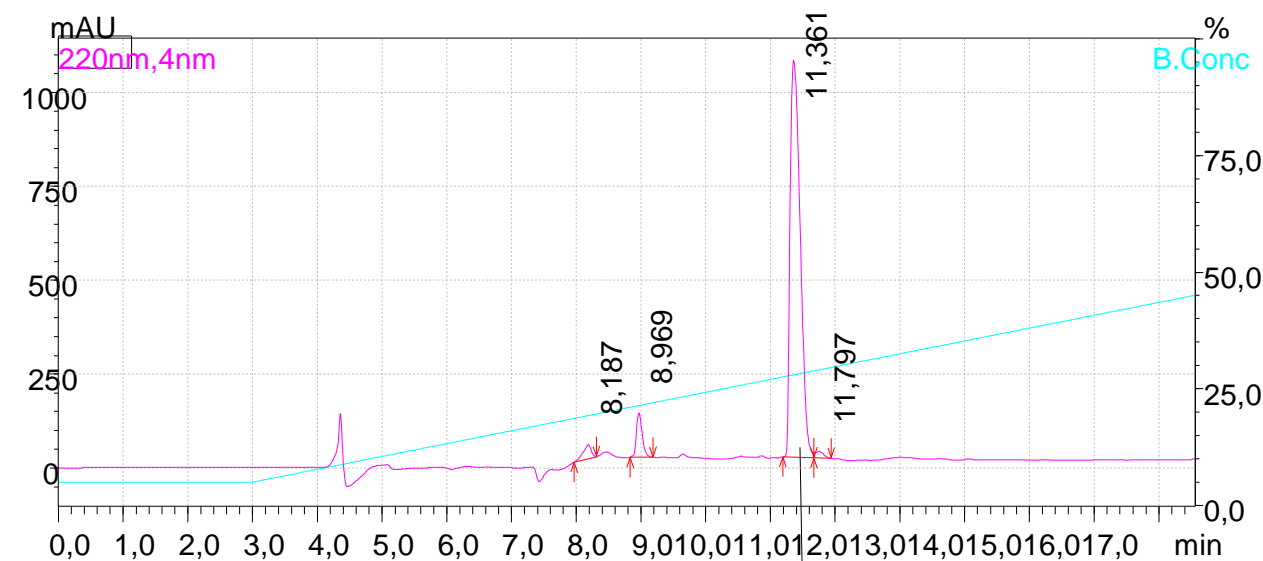
Sample Type : Unknown

Acquired by : System Administrator
 Processed by : System Administrator

Datafile Name:karina34.lcd

Sample Name:Karina PKI1

Sample ID:PKI1 purity test



Peak Table

PDA Ch1 220nm

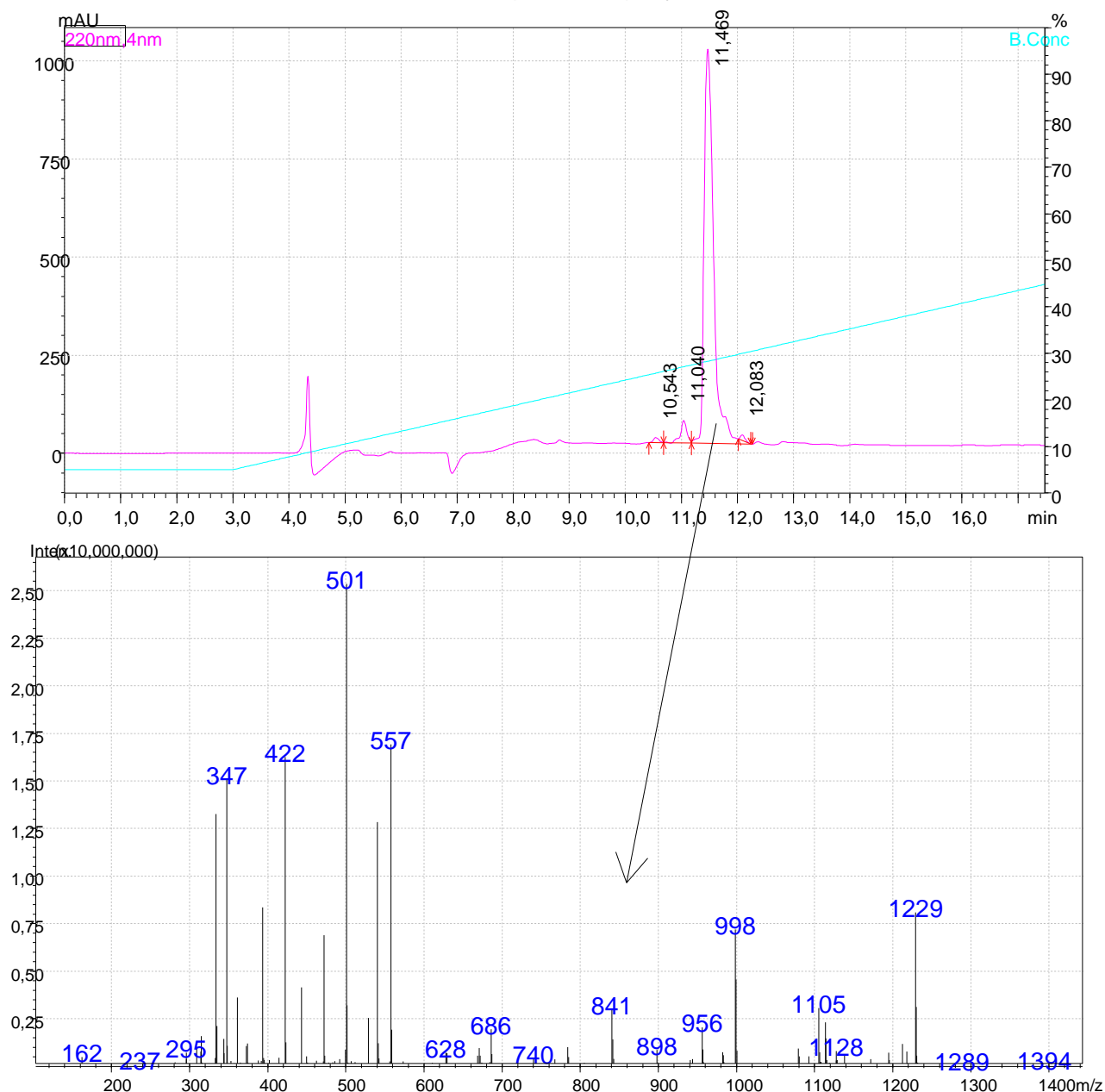
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc
1	8.187	327360	36832	2.569
2	8.969	718284	117482	5.637
3	11.361	11540148	1057463	90.569
4	11.797	156022	13929	1.224
Total		12741814	1225706	

PKI 2: GRTGRRNAI-NH₂ Purity

Sample Name : Karina PKI2
 Sample ID : PKI2 purity test
 Data Filename : karina38.lcd
 Method Filename : gerda1uus.lcm
 Batch Filename :
 Vial # : -1
 Injection Volume : 20 µL
 Date Acquired : 9.04.2015 15:11:24
 Date Processed : 9.04.2015 15:58:40

Sample Type : Unknown
 Acquired by : System Administrator
 Processed by : System Administrator

Datafile Name: karina38.lcd
 Sample Name: Karina PKI2
 Sample ID: PKI2 purity test



Peak Table

PDA Ch1 220nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.
1	10,543	82906	12680	0,666
2	11,040	449966	57323	3,613
3	11,469	11848698	1004656	95,143
4	12,083	71980	13455	0,578
Total		12453550	1088114	

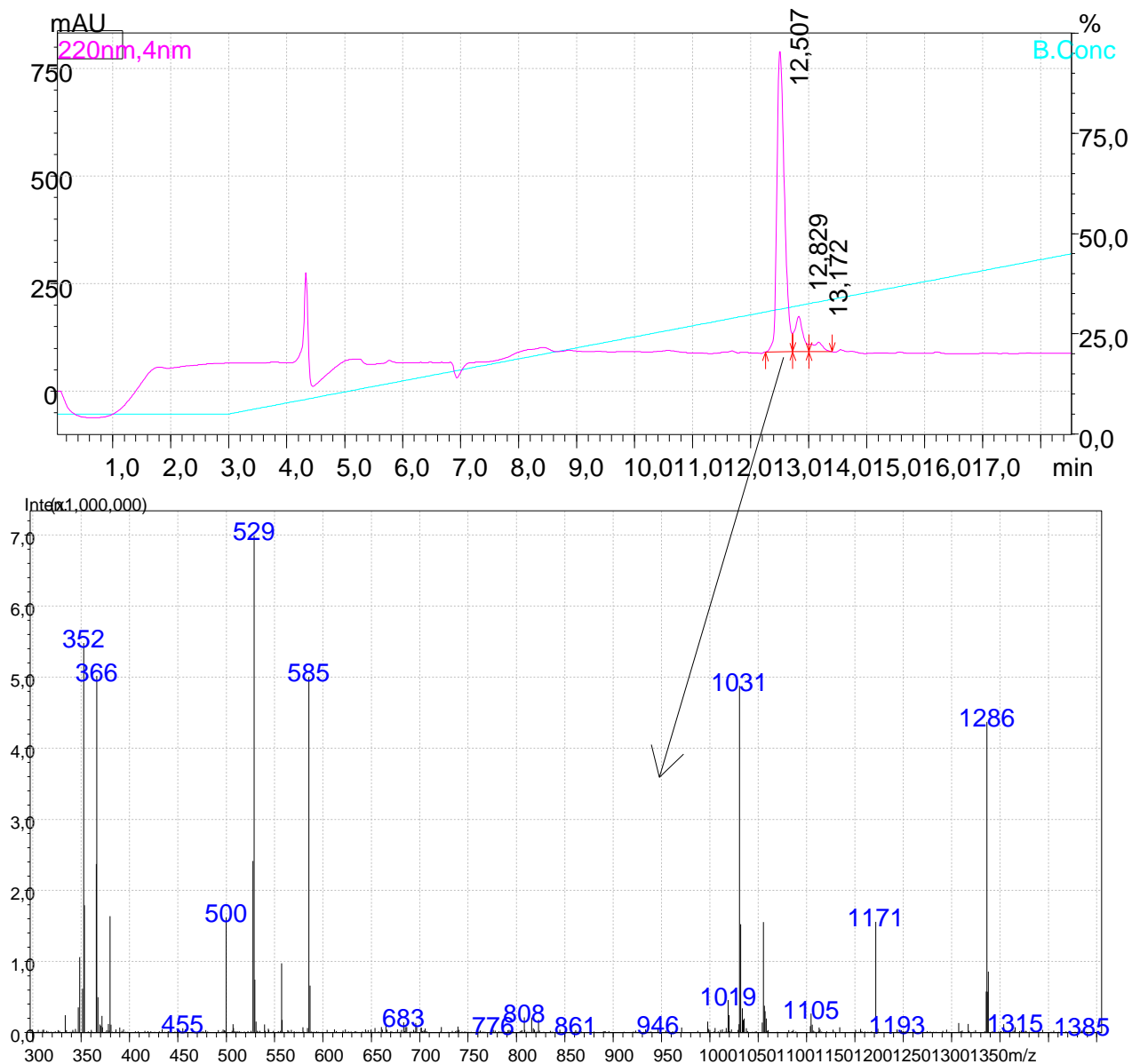
PKI 2*: GRTLRRNAI-NH₂ Purity

Sample Name : Karina PKI2*
 Sample ID : PKI2* purity test
 Data Filename : karina35.lcd
 Method Filename : gerda1uus.lcm
 Batch Filename :
 Vial # : -1
 Injection Volume : 20 µL
 Date Acquired : 9.04.2015 13:27:52
 Date Processed : 23.05.2015 22:39:25

Sample Type : Unknown

Acquired by : System Administrator
 Processed by : System Administrator

Datafile Name:karina35.lcd
 Sample Name:Karina PKI2*
 Sample ID:PKI2* purity test



Peak Table

PDA Ch1 220nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.
1	12,507	6420454	698047	85,371
2	12,829	808333	82544	10,748
3	13,172	291822	22396	3,880
Total		7520609	802988	

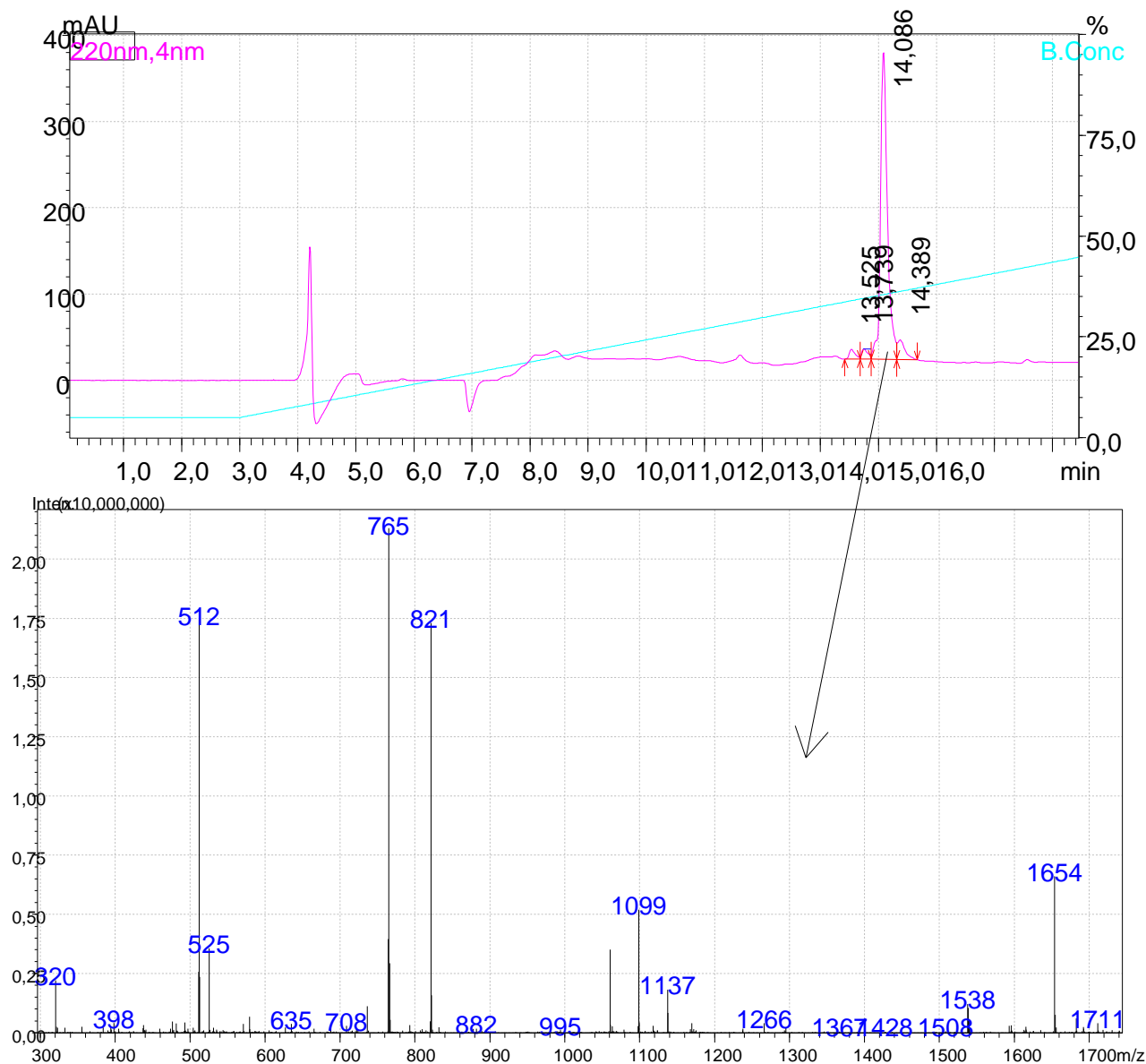
PKI 3: DFIASGRTGRRNAI-NH₂

Purity

Sample Name : Karina PKI3
 Sample ID : PKI3 purity test
 Data Filename : karina37.lcd
 Method Filename : gerda1uus.lcm
 Batch Filename :
 Vial # : -1
 Injection Volume : 20 µL
 Date Acquired : 9.04.2015 14:39:35
 Date Processed : 9.04.2015 15:24:32

Sample Type : Unknown
 Acquired by : System Administrator
 Processed by : System Administrator

Datafile Name:karina37.lcd
 Sample Name:Karina PKI3
 Sample ID:PKI3 purity test



Peak Table

PDA Ch1 220nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc
1	13.525	81400	10675	2.447
2	13.739	92950	11807	2.794
3	14.086	2947274	355177	88.602
4	14.389	204807	22212	6.157
Total		3326431	399871	

PKI 4: YADFIASGRTGRRNAI-NH₂

Purity

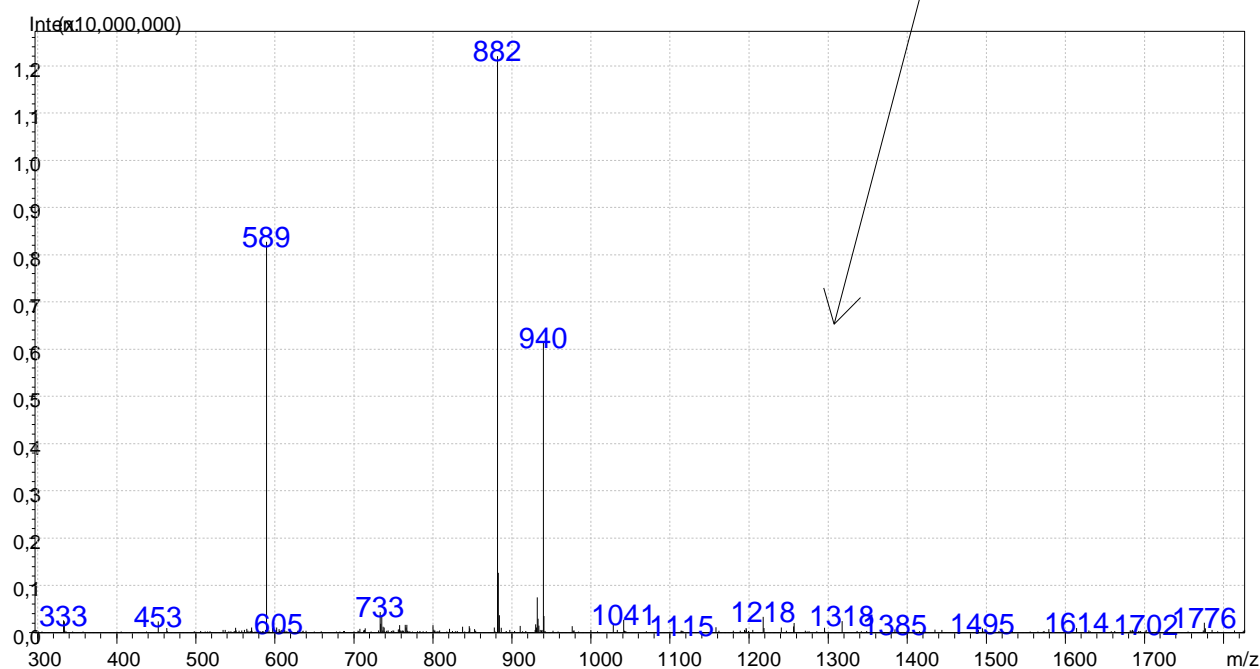
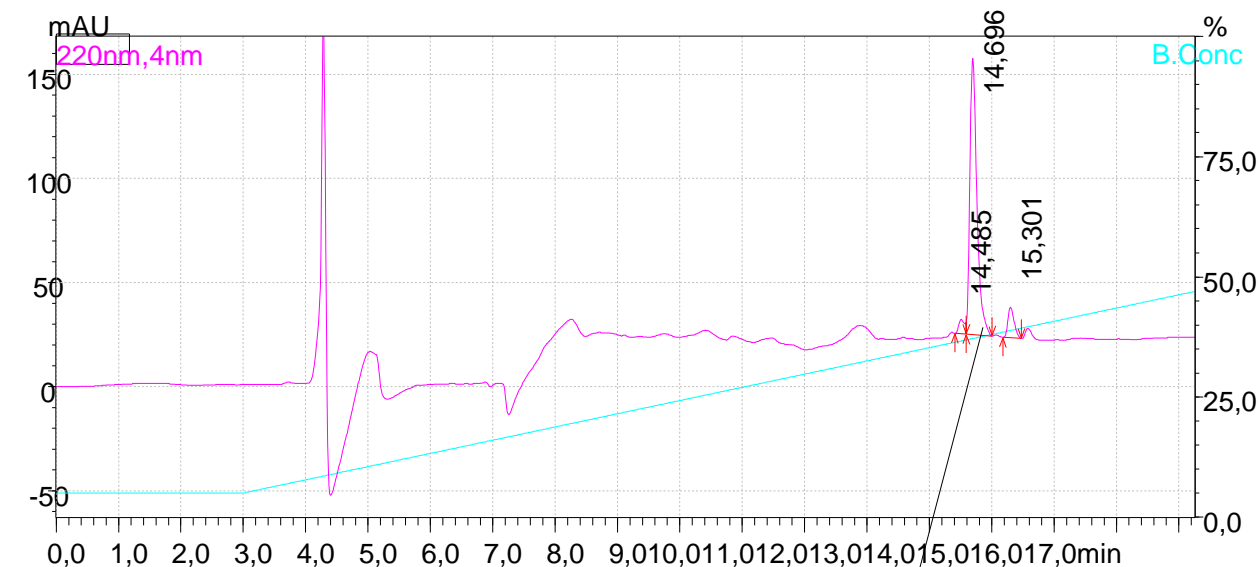
Sample Name : Karina PKI4 vial F3põhi
 Sample ID :
 Data Filename : karina31.lcd
 Method Filename : gerda1uus.lcm
 Batch Filename :
 Vial # : -1
 Injection Volume : 8 µL
 Date Acquired : 7.04.2015 19:54:08
 Date Processed : 22.05.2015 22:07:43

Sample Type : Unknown

Acquired by : System Administrator
 Processed by : System Administrator

Datafile Name: karina31.lcd

Sample Name: Karina PKI4 vial F3põhi



Peak Table

PDA Ch1 220nm

Peak#	Ret. Time	Height	Conc
1	14.485	5562	4.082
2	14.696	132679	87.225
3	15.301	14717	8.693
Total		152957	

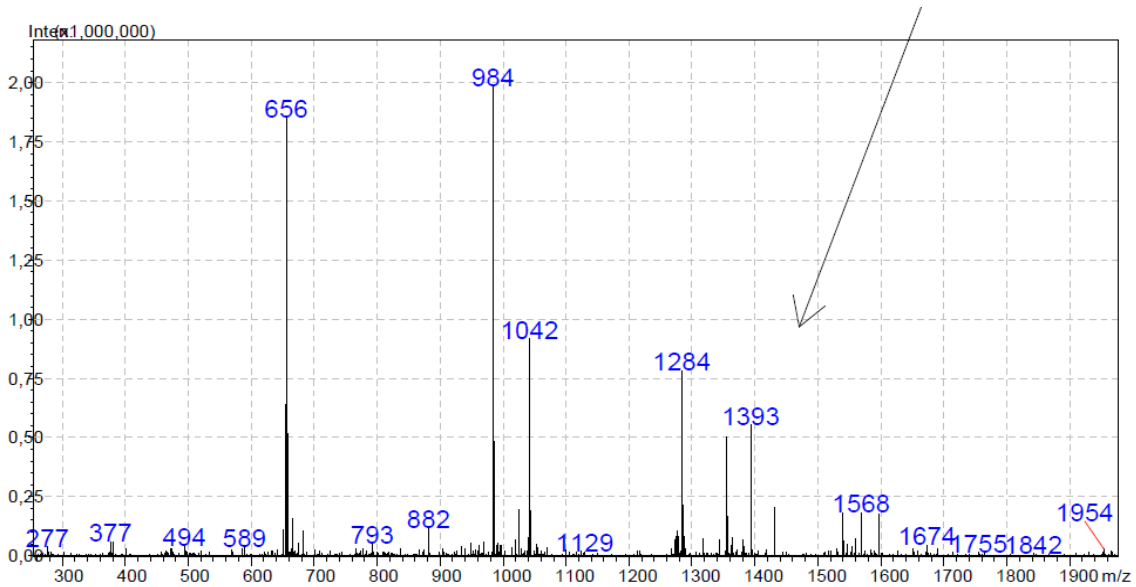
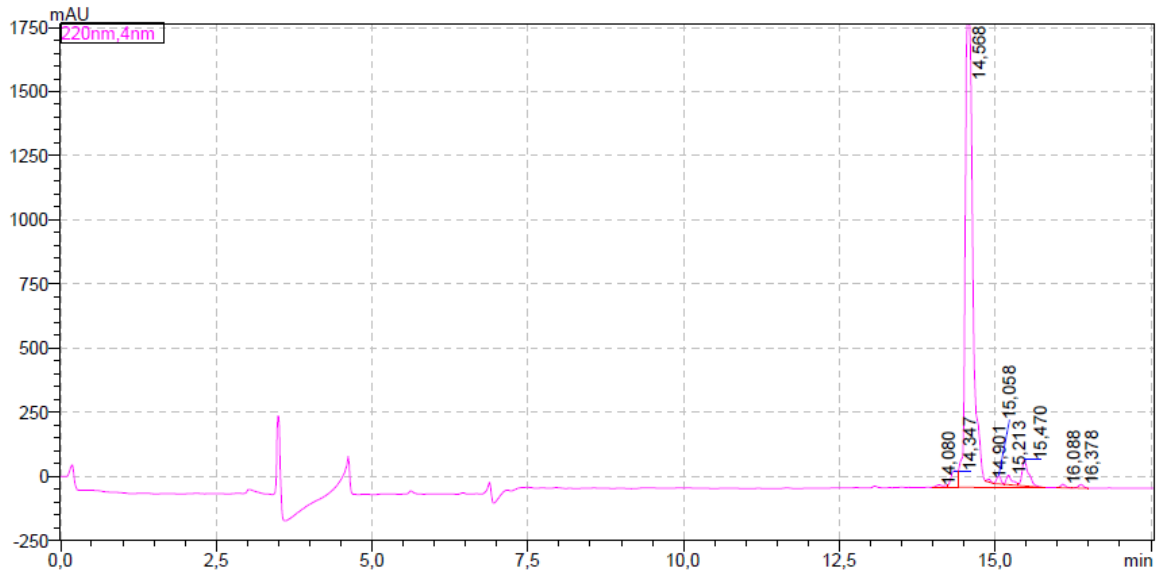
PKI 5: TTYADFIASGRTGRRNAI-NH₂

Purity

Sample Name : pept2
 Sample ID :
 Data Filename : karina23.lcd
 Method Filename : karina.lcm
 Batch Filename :
 Vial # : -1
 Injection Volume : 15 uL
 Date Acquired : 24.05.2015 0:24:54
 Date Processed : 24.05.2015 0:53:38

Sample Type : Unknown
 Acquired by : System Administrator
 Processed by : System Administrator

Datafile Name: karina23.lcd
 Sample Name: pept2



Peak Table

PDA Ch1 220nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.
1	14.080	96491	9156	0.521
2	14.347	471039	64235	2.542
3	14.568	16657444	1950925	89.887
4	14.901	37551	11461	0.203
5	15.058	142216	31734	0.767
6	15.213	235076	36842	1.269
7	15.470	737953	101756	3.982

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks

Mina, Karina Solovjova,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

Akrülodaaniga märgistatud cAMP-st sõltuva proteiinkinaasi A katalüütilise alaühiku seostumine inhibiitorpeptiididega

mille juhendaja on Prof. Jaak Järv

reprodutseerimiseks ainult säilitamise, sealhulgas digitaalarhiivis DSpace säilitamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni. Lõputöö avaldamine ei ole lubatud.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud reprodutseerimise õigus jääb alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, **25.05.2015**